

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BEATRIZ BÖGER

MICROPOLUENTES DE ORIGEM FARMACÊUTICA: OCORRÊNCIA EM
CORPOS HÍDRICOS, IMPACTO AMBIENTAL E ESTUDO DE DEGRADAÇÃO

CURITIBA

2020

BEATRIZ BÖGER

MICROPOLUENTES DE ORIGEM FARMACÊUTICA: OCORRÊNCIA EM
CORPOS HÍDRICOS, IMPACTO AMBIENTAL E ESTUDO DE DEGRADAÇÃO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutora no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadores: Prof. Dr. Klaus Fischer e

Prof. Dr. Patricio Guillermo-Peralta Zamora

CURITIBA

2020

Böger, Beatriz

Micropoluentes de origem farmacêutica [recurso eletrônico]: ocorrência em corpos hídricos, impacto ambiental e estudo de degradação / Beatriz Böger – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Prof. Dr. Klaus Fischer

Coorientador: Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta-Zamora

1. Resíduos. 2. Fármacos. 3. Poluentes ambientais. 4. Bactérias.
5. Desequilíbrio ecológico. I. Pontarolo, Roberto. II. Fischer, Klaus. III. Peralta-Zamora, Patricio Guillermo. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BEATRIZ BOGER** intitulada: **Micropoluentes de origem farmacêutica: ocorrência em corpos hídricos, impacto ambiental e estudo de degradação.**, sob orientação do Prof. Dr. ROBERTO PONTAROLO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica
09/09/2020 13:58:35.0
ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
09/09/2020 13:28:04.0
FERNANDA STUMPF TONIN
Avaliador Externo (PÓS-DOC/UFPR)

Assinatura Eletrônica
10/09/2020 21:38:13.0
HARRY ALBERTO BOLLMANN
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
10/09/2020 22:35:38.0
DANIELE MAIA BILA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO)

Assinatura Eletrônica
30/09/2020 11:45:20.0
MARCUS VINICIUS DE LIZ
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)

*A minha família,
Origem da minha vida, identidade e valores, meu porto seguro,
fonte de alegria e incentivadora dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me revelar o melhor caminho e me responder com pequenos sinais às minhas dúvidas, por me mostrar as oportunidades e as pessoas certas nos momentos oportunos.

A minha família, por apoiarem minhas escolhas e por serem meu porto seguro. Em especial ao meu Pai, Jaime Böger, por ser minha referência, por fornecer as condições necessárias para todos esses anos de estudo e pelo amor incondicional; a minha irmã, Bianca, pelo companheirismo e a melhor amizade; a minha mãe, Adrianne, pela minha vida; e ao meu marido Samuel, por compartilhar as alegrias e as tristezas durante todo o meu período acadêmico, sempre se fazer presente mesmo quando distante e manter meus pés no chão.

A todos meus colegas do Cebinho, vocês tornaram a rotina mais leve e agregaram imensamente à minha jornada profissional de diversas maneiras, com ensinamentos diários e ouvidos sempre disponíveis. Tenho certeza de que além de colegas de profissão fiz também amigos para a vida, em especial Mariana Fachi, Raquel Vilhena e Fernanda Tonin.

Aos meus orientadores Dr. Roberto Pontarolo, Dr. Klaus Fischer e Dr. Patrício Zamora por me orientarem no doutorado e dividirem esta conquista comigo. Espero que possamos continuar trabalhando juntos. Em especial ao professor Pontarolo, um exemplo de competência e dedicação, que me aceitou sem saber meu background e que só me fez voar.

A equipe que me recebeu em Trier, Klaus Fischer, Karin Fischer, Marion Wacht e Susanne Höffler pela paciência e carinho que tiveram comigo e por deixarem mais quente e confortável o meu coração no inverno alemão.

A todos os professores da minha vida e aqueles que sempre me apoiaram a seguir o caminho da docência como Dr. Walfrido Svoboda, Dra. Eliane Carneiro, Dra. Yanna Rattmann e Dra. Milene Zanoni.

À CAPES, a UFPR, a Universität Trier, PPGCF, ao Analytische und Ökologische Chemie Labor, ao Laboratório de Saúde Pública e Ambiental, ao Tecnotrater e ao CEB-UFPR, os primeiros por financiarem a pesquisa e os últimos serem locais harmoniosos de trabalho para a ciência. Sou muito grata aos espaços que frequentei, por fornecer condições estruturais e oportunidades de crescimento intelectual.

Por fim, agradeço a mim mesma por acreditar em mim, na minha capacidade, por perseverar frente as dificuldades, criar oportunidades, manejar o tempo, aproveitar ao máximo tudo que me é oferecido, por me adaptar as situações, países, idiomas e rotinas estressantes, correr atrás dos meus objetivos- mesmo que longe da minha família, amigos, país e zona de conforto. Entretanto, tudo isso só foi possível, graças a todo suporte dos descritos acima.

MUITO OBRIGADO A TODOS por esses quatro anos incríveis.

"Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta.
Pois tudo o que pede recebe; o que busca encontra; e àquele que bate,
a porta será aberta."

(Mateus 7:7-8)

RESUMO

O crescimento da população e o aumento da expectativa de vida geraram o aumento no uso de medicamentos, e consequentemente os resíduos gerados por eles no meio ambiente. Com o avanço da tecnologia analítica tornou-se possível detectar e monitorar traços de resíduos farmacêuticos em diferentes matrizes ambientais. Apesar desses resíduos representarem um importante risco para a saúde humana e afetando direta e indiretamente a qualidade das águas, estudos avaliando sua presença em águas de bacias hidrográficas brasileiras são escassos. Logo, o presente estudo teve como objetivo geral investigar a presença, o impacto ambiental e propor um método de degradação de micropoluentes em matrizes ambientais. Inicialmente, para a quantificação dos micropoluentes de diferentes classes farmacêuticas (antibióticos, psicotrópicos, anti-inflamatórios, analgésicos, antirretrovirais e antidiabéticos, entre outros) em rios da bacia do Iguaçu localizada no Estado do Paraná-Brasil, foi desenvolvido e validado um método por SPE- HPLC-MS/MS. O método validado mostrou-se seletivo ($p > 0,05$), linear ($10-100 \text{ ng L}^{-1}$ e $20-200 \text{ ng L}^{-1}$), preciso ($p > 0,05$) e exato ($ER > -50$ ou $ER < 20$), com limite de detecção ($10 \text{ a } 100 \text{ ng L}^{-1}$) e limite de quantificação ($20 \text{ a } 200 \text{ ng L}^{-1}$) adequados para baixas concentrações. Foram encontrados medicamentos de diferentes classes em todas as amostras investigadas. A cafeína e a lidocaína estavam presentes em todas as amostras coletadas ($n=16$) nesse trabalho. Da classe dos antibióticos, o sulfametoxazol foi o resíduo farmacêutico de maior ocorrência ($n=14$), seguido da amoxicilina e azitromicina. Concentrações altas de amoxicilina ($6,35 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) foram quantificadas. Constatou-se também a presença desses resíduos em amostra de água tratada, o que indica que o método de tratamento empregado na Estação de Tratamento localizada na região metropolitana de Curitiba - Brasil não foi eficiente para remover alguns dos resíduos farmacêuticos (acetaminofeno, azitromicina, cafeína, captopril, carbamazepina, cetoprofeno, diazepam, enalapril, glibenclamida, glimepirida, lindocaína e metformina). Considerando a presença de antibióticos nas amostras de água dos rios Belém e Barigui, da cidade de Curitiba - Brasil, investigou-se também, a presença de bactérias resistentes em meios seletivos com os antibióticos incorporados na concentração inibitória mínima. *Escherichia coli* foi resistente a amoxicilina, norfloxacin, ciprofloxacina, doxiciclina e sulfametoxazol. Cepas produzindo β -lactamase com espectro estendido (ESBL e AmpC) também foram encontradas nesses isolados. *Enterococcus spp.* apresentaram resistência à norfloxacin e ciprofloxacina, e alguns isolados foram resistentes à vancomicina, gentamicina e estreptomicina. O estudo de degradação dos antibióticos (azitromicina, norfloxacin, ciprofloxacina e amoxicilina), pelo processo de fotocatalise heterogênea (TiO_2), mostrou 100% de remoções desses medicamentos em matriz aquosa. A cinética de degradação dos fármacos pela fotocatalise foi semelhante, tanto na constante de degradação, norfloxacin ($k = 0,006 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0,925$); azitromicina ($k = 0,0065 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0,966$); ciprofloxacina ($k = 0,005 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0,953$); doxiciclina ($k = 0,005 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0,928$), quanto no tempo de degradação ($>10 \text{ min}$). Por último, investigou-se o impacto dos micropoluentes vanádio e tungstênio, por um método fluorimétrico, na atividade enzimática do lodo coletado nas estações de tratamento de esgoto da cidade de Trier - Alemanha. Esses metais, mesmo em baixas concentrações ($1 \text{ a } 1000 \text{ } \mu\text{M}$), demonstraram efeito inibitório (vanádio, IC_{50} : 2,4; tungstênio, IC_{50} : 2,6) sobre a fosfatase alcalina presente na matriz lodo. Como conclusão, pressupõe-se que os micropoluentes presentes nessas diferentes amostras ambientais sejam provenientes de efluentes domésticos, e que eles podem contribuir para um desequilíbrio ecológico importante. Esses dados destacam a importância do monitoramento contínuo de micropoluentes em matrizes ambientais para subsidiar o estabelecimento de valores de referência e assim dar suporte a uma nova legislação, além de reforçar a importância de um saneamento básico universal e adequado.

Palavras-chave: Resíduos. Fármacos. Poluentes ambientais. Bactérias. Desequilíbrio ecológico.

ABSTRACT

The population growth and the increase in life expectancy generated an increase in the use of medicines, and consequently on the waste generated by them in the environment. Advances in analytical technology allowed further detection and monitoring of traces of pharmaceutical residues in different environmental matrices. Although these residues represent an important risk to human health and may affect water quality – both direct and indirectly, studies evaluating their presence in waters of Brazilian watersheds are still scarce. Therefore, our aim was to investigate the presence, environmental impact, degradation of micropollutants in environmental matrices. We initially developed and validated a method by means of SPE- HPLC-MS/MS to quantify micropollutants of different pharmaceutical classes (e.g. antibiotics, psychotropics, anti-inflammatories, analgesics, antiretrovirals, antidiabetics) in rivers in the Iguaçu basin located in the state of Paraná – Brazil. The method was selective ($p > 0.05$), linear (10-100 ng L⁻¹ and 20-200 ng L⁻¹), precise ($p > 0.05$) and accurate (ER > -50 or ER < 20), with detection limit (10 to 100 ng L⁻¹) and quantification limit (20 to 200 ng L⁻¹) suitable for low concentrations. Drugs of different classes were found in all investigated samples. Caffeine and lidocaine were observed in all samples collected (n = 16) in this study. Among the antibiotics, sulfamethoxazole was the most common pharmaceutical residue (n = 14), followed by amoxicillin and azithromycin. High concentrations of amoxicillin (6.35 µg L⁻¹) were quantified. These residues were also detected in a sample of treated water, which indicates that the treatment method used by the treatment stations located in the metropolitan region of Curitiba - Brazil was not efficient to remove some substances (i.e. acetaminophen, azithromycin, caffeine, captopril, carbamazepine, ketoprofen, diazepam, enalapril, glibenclamide, glimepiride, lidocaine and metformin). Given the presence of antibiotics in water samples from Belém and Barigui rivers (Curitiba – Brazil), we also investigated by means of selective media with antibiotics incorporated in the minimum inhibitory concentration, the existence of resistant bacteria. *Escherichia coli* was resistant to amoxicillin, norfloxacin, ciprofloxacin, doxycycline and sulfamethoxazole. Strains producing β -lactamase with extended spectrum (ESBL and AmpC) were also found in these isolates. *Enterococcus spp.* showed resistance to norfloxacin and ciprofloxacin, and some isolates were resistant to vancomycin, gentamicin and streptomycin. The degradation study of antibiotics (azithromycin, norfloxacin, ciprofloxacin and amoxicillin) by heterogeneous photocatalysis (TiO₂), showed 100% removal of these drugs in an aqueous matrix. Drugs' degradation kinetics by photocatalysis showed similar results, both in the degradation constant [norfloxacin ($k = 0.006 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0.925$); azithromycin ($k = 0.0065 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0.966$); ciprofloxacin ($k = 0.005 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0.953$); doxycycline ($k = 0.005 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0.928$)], and degradation time (> 10 min). Finally, we evaluated the impact of the micropollutants vanadium and tungsten on the enzymatic activity of the sludge collected in the sewage treatment plants of the city of Trier – Germany through a fluorimetric method. These metals, even at low concentrations (1 to 1000 µM), demonstrated an inhibitory effect (vanadium, IC₅₀: 2.4; tungsten, IC₅₀: 2.6) on the alkaline phosphatase available in the sludge matrix. Thus, we can assume that the micropollutants present in these different environmental samples come from domestic effluents, contributing to an ecological imbalance. Our data highlight the importance of continuous monitoring of micropollutants in environmental matrices. This may support the establishment of substances' reference values, and the development of new legislations, and additionally reinforce the need for universal and adequate basic sanitation.

Keywords: Waste. Pharmaceuticals. Environmental pollutants. Bacteria. Ecological imbalance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Transição dos analitos usados para qualificação e parâmetros do MRM.....	50
Tabela 2. Valores de precisão, exatidão e recuperação obtidos em cada nível de concentração	53
Tabela 3. Parâmetros da validação do método SPE - HPLC - MS/MS.....	55
Tabela 4. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos resíduos farmacêuticos investigados nas amostras de água dos rios Belém, Barigui, Atuba, Iguaçu e na ETAI.....	58
Tabela 5. Condições operacionais de espectrometria de massa para análises de antibióticos.	68
Tabela 6. Concentração de antibióticos inoculados em meios seletivos de acordo com a <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (CLSI).	70
Tabela 7. Características físico-químicas das amostras de água dos rios.....	72
Tabela 8. Parâmetros de validação do método HPLC - MS/MS	74
Tabela 9. Valores de precisão e exatidão obtidos em cada nível de concentração.....	74
Tabela 10. Concentrações de resíduos de antibióticos encontrados nas amostras de águas superficiais dos rios Belém e Barigui.	76
Tabela 11. Bactérias resistentes aos antibióticos testados em diferentes locais.....	78
Tabela 12. Identificação das espécies de <i>Enterococcus spp.</i> presentes nas amostras de águas superficiais.....	81
Tabela 13. Principais propriedades físico-químicas dos padrões utilizados.	90
Tabela 14. Quantidade de enzima disponível, faixa de concentração dos inibidores testados e IC50 de cada experimento realizados com vanádio (n=10) e tungstênio (n=9) como inibidores da enzima fosfatase presente em amostras de lodo da ETE de Trier-Alemanha.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de inserção dos micropoluentes de origem farmacêutica em cursos d'água.	22
Figura 2. Esquema de um floco de lodo ativado.	39
Figura 3. Rios selecionados para os locais de coleta das amostras de água em Curitiba-Brasil.....	47
Figura 4. Cromatogramas de íons extraídos correspondentes à análise de produtos farmacêuticos por HPLC - MS/MS.	52
Figura 5. Locais selecionados para coleta das amostras nos rios Belém (1) e Barigui (2) em Curitiba - Brasil.	67
Figura 6. A- Cromatograma dos extratos da matriz com fortificação do limite de quantificação de antibióticos, matriz, e fase móvel no modo de ionização positiva. B- Cromatograma dos extratos da matriz com fortificação máxima da curva de calibração dos antibióticos.	73
Figura 7. Representação do reator fotoquímico de bancada utilizado.....	87
Figura 8. Remoção de ciprofloxacino, norfloxacino, azitromicina e doxiciclina durante a fotocatalise mediada por TiO ₂ e assistida por radiação UV	91
Figura 9. Perfil de degradação por fotocatalise dos antibióticos estudados em solução de 10 µg mL ⁻¹ em água MilliQ, 50 mg de TiO ₂ e submetidas a irradiação por 30 min.	94
Figura 10. Representação esquemática das microplacas usadas para o estudo de inibição da enzima fosfatase pelo o vanádio..	103
Figura 11. Experimentos realizados com vanádio, como inibidor da enzima fosfatase presente em amostras de lodo da ETE de Trier-Alemanha..	106
Figura 12. Experimentos realizados com tungstênio, como inibidor da enzima fosfatase presente em amostras de lodo da ETE de Trier-Alemanha.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	-	Acetonitrila
ANOVA	-	Análise de variância
AmpC	-	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ATCC	-	<i>American Type Culture Collection</i>
C18	-	Octadecil
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	-	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DPR	-	Desvio padrão relativo
DBO	-	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	-	Demanda Química de Oxigênio
EC	-	<i>European Community</i> (União Européia)
ETE	-	Estação de Tratamento de Esgoto
ETA	-	Estação de Tratamento de Água
ETAI	-	Estação de Tratamento de Água Industrial
ESI	-	<i>Electrospray ionization</i> (Ionização por electropulverização)
ESBL	-	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> (β -lactamase com espectro estendido)
FE	-	Fase Estacionária
FM	-	Fase Móvel
GC	-	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia gasosa)
HPLC	-	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
ICH	-	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INMETRO	-	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade e Tecnologia
IC 50	-	Concentração de droga para 50% de inibição
LC	-	Cromatografia Líquida
LoD	-	<i>Limit of detection</i> (Limite de detecção)
LoQ	-	<i>Limit of Quantification</i> (Limite de quantificação)
MS	-	<i>Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas)
POA	-	Processos Oxidativos Avançados
WHO	-	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
SPE	-	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
USEPA	-	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i> Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UFC	-	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 RESÍDUOS FARMACÊUTICOS NO MEIO AMBIENTE	17
3.1.1 Ocorrência de resíduos farmacêuticos em diferentes regiões do mundo	18
3.2 ORIGEM, VIAS DE INSERÇÃO E DESTINO NO MEIO AMBIENTE	21
3.3 IMPACTOS AMBIENTAIS	24
3.3.1. Toxicidade ecológica	25
3.3.2. Toxicidade humana	26
3.3.3. Resistência	26
3.3.4 Desregulares endócrinos	27
3.4 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL E NACIONAL	28
3.5 FERRAMENTAS DE MONITORAMENTO	30
3.5.1 Condicionamento e armazenamento	30
3.5.2 Procedimentos de extração e limpeza	30
3.5.3 Técnicas hifenadas	31
3.5.3.1 Técnicas de separação	32
3.5.3.2 Dispositivos de detecção	32
3.5.4 Efeitos matriciais	34
3.5.5 Validação	35
3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS	36
3.7 OPERAÇÕES UNITÁRIAS COMUMENTE EMPREGADAS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES	38
3.7.1 Processos oxidativos avançados	40
4. CAPÍTULO I	42
4.1 INTRODUÇÃO	43
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.2.1 Seleção dos medicamentos	45
4.2.2. Reagentes e insumos	45

4.2.3 Área de estudo	46
4.2.4 Preparo de amostra	47
4.2.5 Técnicas de análise e condições analíticas	47
4.2.6 Validação analítica	49
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.3.1 Otimização do método HPLC - MS/MS	50
4.3.2 Validação do método	53
4.3.3 Avaliação global da ocorrência e concentração dos fármacos	56
4.3.4 Avaliação da dispersão dos fármacos no rio Belém	60
4.3.5 Avaliação da remoção dos fármacos em uma ETAI	61
4.4. CONCLUSÃO	62
5. CAPÍTULO II	63
5.1 INTRODUÇÃO	64
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	65
5.2.1 Reagentes e Insumos	65
5.2.3 Área de estudo	66
5.2.4 Preparo de amostra	67
5.2.5 Técnicas de análise e condições analíticas	68
5.2.6 Validação analítica	69
5.2.7 Teste de resistência ao antibiótico	70
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.3.1 Caracterização físico-química das amostras	72
5.3.2 Validação do método	73
5.3.3 Antibióticos nas amostras de água dos rios	75
5.3.4 Bactérias resistentes nas amostras de água dos rios	78
5.4 CONCLUSÃO	83
6. CAPÍTULO III	84
6.1 INTRODUÇÃO	85
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	86
6.2.1 Reagentes e Insumos	86
6.2.2 Tratamento fotoquímico	87
6.2.3 Análise das amostras por HPLC - MS/MS	88
6.2.4 Ajuste do perfil cinético	88

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
6.3.1 Degradação por fotocálise heterogênea	89
6.3.2 Cinética de degradação	93
6.4 CONCLUSÃO	94
7. CAPÍTULO IV	96
7.1 INTRODUÇÃO	97
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	98
7.2.1 Área de estudo	98
7.2.2 Preparo de amostra e pré-tratamento das amostras	99
7.2.3 Preparo de padrões	99
7.2.4 Ensaio enzimático	100
7.2.5 Análise estatística	104
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
7.4 CONCLUSÃO	108
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
REFERÊNCIAS	112

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da produção de mercadorias é considerado um indicador positivo de desenvolvimento socioeconômico. Entretanto, é importante ponderar sobre o ciclo de vida e destino dos resíduos provenientes destes processos produtivos (lixo, embalagens e dejetos) (MINAYO; DE MIRANDA, 2002). Estes poluentes são continuamente introduzidos no meio ambiente por diferentes rotas e em concentrações que nem sempre são facilmente detectáveis sendo denominados de micropoluentes. Estes podem afetar a saúde dos ecossistemas, a qualidade da água e potencialmente impactar no suprimento de água potável (BILA; DEZOTTI, 2007, AUS DER BEEK et al., 2016).

Tradicionalmente, quando se fala de micropoluentes orgânicos o foco são poluentes convencionais, como os hidrocarbonetos policíclicos, aromáticos, bifenilos, policlorados e os pesticidas organoclorados. Entretanto, micropoluentes orgânicos também podem ser espécies químicas oriundas de produtos de limpeza, produtos de higiene pessoal e, em particular, de produtos farmacêuticos (AUS DER BEEK et al., 2016).

Em todo o mundo, o número de estudos avaliando concentrações mensuráveis (níveis na ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$) de resíduos de origem farmacêutica nas diversas matrizes ambientais tem aumentado, com foco especial para o monitoramento de fármacos residuais em efluentes de estações de tratamento de esgoto e águas naturais (YING; KOOKANA; RU, 2002; SANTOS et al., 2010; K'OREJE et al., 2012; GUERRA et al., 2014; CAMPANHA et al., 2015; CONTE et al., 2017; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). No Brasil, esses estudos ainda são limitados, especialmente se levarmos em conta as dimensões do país e a quantidade de recursos hídricos existentes (HEBERER, 2002^a; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2009; DE ALMEIDA et al., 2013; CAMPANHA et al., 2015; JONES et al., 2017; STARLING; AMORIM, LEÃO, 2019).

O impacto desses resíduos de origem farmacêutica no meio ambiente e para a saúde humana ainda é pouco conhecido, porém tem sido relacionado ao aparecimento de efeitos adversos à organismos presentes nas águas, como os peixes, com destaque para alterações no sistemas endócrino e reprodutivo e mecanismos de resistência bacteriana (IWANE et al., 2007; GUNNARSSON et al., 2008; SANTOS et al., 2010).

Suspeita-se que mesmo em baixas concentrações em ambientes aquáticos, esses resíduos já sejam suficientes para deteriorar a qualidade das águas utilizadas em abastecimento público como fonte de água potável. Adicionalmente, estudos evidenciam que muitos desses micropoluentes são resistentes ao tratamento convencional de esgotos e de potabilização de águas. Apesar das legislações ambientais da maioria dos países industrializados regular um amplo espectro de fontes de poluição, essa regulação nem sempre é sensível o suficiente para detecção de micropoluentes (ALVES; GIRARDI; PINHEIRO, 2017).

Visto que nesse contexto existe um desafio para o aprimoramento e desenvolvimento de métodos analíticos multiclasses, suficientemente sensíveis para detecção e quantificação de resíduos farmacêuticos em matrizes ambientais, que auxiliem na avaliação da qualidade da água, no monitoramento dos resíduos nos ecossistemas brasileiros (TERNES et al., 1999; IWANE et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2017) e na quantificação da remoção desses micropoluentes por Estações de Tratamento de Água (ETA) e Esgoto (ETE) (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; IWANE et al., 2007; AUS DER BEEK et al., 2016; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). Além de na literatura científica sobre a presença de bactérias resistentes em ambientes aquáticos brasileiros (DROPA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2017), e sobre os efeitos que os micropoluentes podem causar nas atividades enzimáticas que ocorrem no tratamento de esgoto (MAKINEN, 1985; STANKIEWICZ; GRESSER, 1988; FOSTER et al., 1998; CRANS, 2015; DANIKOWSKI; CHENG, 2018) este trabalho se justifica, porque se propõe a preencher essas lacunas apresentadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença, impacto ambiental e estudo de degradação de micropoluentes em matrizes ambientais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I: Desenvolver e validar um método SPE - HPLC - MS/MS para identificação e quantificação de resíduos farmacêuticos em matriz aquosa ambiental.

Capítulo II: Investigar a presença de bactérias resistentes aos antibióticos presentes em corpos aquosos.

Capítulo III: Propor um processo de degradação para os antibióticos encontrados.

Capítulo IV: Investigar a influência de micropoluentes inorgânicos (vanádio e o tungstênio) na atividade enzimática da enzima fosfatase do lodo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 RESÍDUOS FARMACÊUTICOS NO MEIO AMBIENTE

A ocorrência de produtos farmacêuticos na água não é um fenômeno novo, mas se tornou mais evidente na última década, em parte, devido ao avanço da química analítica (RUNNQVIST et al., 2010; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017) que permitiu a detecção e quantificação de uma ampla variedade de xenobióticos em concentrações extremamente baixas em matrizes complexas (ppb ou ppt). Pesquisas recentes empregam técnicas analíticas cada vez mais sensíveis, reportando quantidades em traços de produtos farmacêuticos e seus metabólitos provenientes de ETE, águas superficiais, água potável e águas subterrâneas (HALLING-SØRENSEN et al., 1998; HEBERER, 2002b; KOLPIN et al., 2002; RUNNQVIST et al., 2010; ZIYLAN; INCE, 2011; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017; FEKADU et al., 2019).

Adicionalmente, um aumento do uso de produtos farmacêuticos nos períodos pós-guerras contribuiu para o aumento desses resíduos nos ecossistemas. As primeiras detecções de contaminação ambiental com micropoluentes foram relatadas na década de 1970 nos Estados Unidos da América (EUA) e em 1980 na Inglaterra (SANTOS et al., 2010; BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018). Desde então, níveis variados de diferentes classes farmacêuticas (hormônios, antibióticos, reguladores lipídicos, anti-inflamatórios, betabloqueadores, retinóides e antisépticos) tem sido reportados no ambiente aquático (HIGNITE; AZARNOFF, 1977; HEBERER, 2002b; BENDZ et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2007; ZIYLAN; INCE, 2011; BERETTA et al., 2014; MATONGO et al., 2015; CHITESCU; LUPOAE; ELISEI, 2016; AUS DER BEEK et al., 2016; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017; FEKADU et al., 2019).

A detecção de micropoluentes no meio ambiente depende das propriedades físico-químicas das substâncias, a proporção que é eliminada pelo organismo humano e suas rotas de entrada para o meio ambiente. Além disso, diferentes tipos de resíduos e concentrações podem ser encontrados em diferentes regiões do mundo, de acordo com o padrão de consumo de medicamentos (KÜMMERER, 2008).

3.1.1 Ocorrência de resíduos farmacêuticos em diferentes regiões do mundo

Na África, pela ausência ou precariedade dos sistemas de saneamento, o resíduo sólido humano é descartado diretamente no solo ou nas águas superficiais (AUS DER BEEK et al., 2016). Nessas áreas, durante a estação das chuvas, a matéria fecal se junta às águas pluviais, contaminando-as. Antirretrovirais, antimaláricos e antibióticos estão entre os fármacos mais encontrados em águas superficiais africanas (MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017). Drogas antimaláricas, como artemeter e lumefantrina, bem como amoxicilina, foram detectadas em concentrações que variavam de 3 a 32 $\mu\text{g L}^{-1}$ na Tanzânia (MIRAJI et al., 2016). Analgésicos, anti-inflamatórios e antiepiléticos foram encontrados com cerca de 30 a 35 $\mu\text{g L}^{-1}$, seguidos por antibióticos/antimaláricos em até 25 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto antivirais foram detectados em até 10 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Na África do Sul também já foi relatada a presença de eritromicina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, tetraciclina, sulfametoxazol, acetaminofeno, atenolol, diclofenaco, ibuprofeno e cafeína na água de superfície de Umgeni e em uma barragem ao longo do rio Umgeni usada para abastecimento de água na KwaZulu-Natal (AGUNBIADE; MOODLEY, 2014).

Na América Latina, o país com maior número de estudos sobre detecção de resíduos farmacêuticos no meio ambiente é o Brasil, apesar de ainda assim existir um número limitado de trabalhos se considerada a relação área territorial/pesquisas locais (AUS DER BEEK et al., 2016). Altas concentrações de dexametasona foram encontradas no rio Ceará (nordeste brasileiro) (589 $\mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que no efluente hospitalar da Universidade de Santa Maria no Rio Grande do Sul reportou-se maior presença de ciprofloxacino (155 $\mu\text{g L}^{-1}$) (AUS DER BEEK et al., 2016).

Além disso, quatro dos antibióticos mais consumidos no Brasil foram frequentemente detectados na água de superfície em São Paulo: amoxicilina, ampicilina, cefalexina e trimetoprim (LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011). Uma das primeiras pesquisas publicadas no Brasil detectou resíduos de drogas polares em esgotos e águas naturais no estado do Rio de Janeiro. Nas águas superficiais utilizadas para produção de água potável, o ácido clofibríco, o diclofenaco e o naproxeno foram frequentemente detectados em baixas concentrações (10-60 ng L^{-1}), porém nenhum desses produtos foi encontrado na água potável propriamente dita (STUMPF et al., 1999). Na Bacia Amazônica, no Rio Negro, foram encontrados os resíduos de fármacos: diclofenaco (88-

528 ng L⁻¹), carbamazepina (14-652 ng L⁻¹), betabloqueadores (metoprolol: 5–13 ng L⁻¹ e propranolol: 26 ng L⁻¹) e ibuprofeno (10–500 ng L⁻¹).

Concentrações semelhantes de diclofenaco também foram detectadas em todas as águas superficiais amostradas no México (FÉLIX-CAÑEDO; DURÁN-ÁLVAREZ; JIMÉNEZ-CISNEROS, 2013; THOMAS et al., 2014). Na Argentina, ibuprofeno, atenolol, carbamazepina e diclofenaco ocorreram na faixa de µg L⁻¹ em todas as amostras de águas residuais municipais tratadas em diferentes áreas urbanas (ELORRIAGA et al., 2013).

Nos Estados Unidos da América (EUA), Kolpin et al. (2002) analisou 22 antibióticos em 139 córregos dispostos em 30 estados, sendo que 14 analitos foram detectados no ambiente. O sulfametoxazol foi encontrado em uma concentração de 1,9 µg L⁻¹ (EBELE; ABOU-ELWAFABDALLAH; HARRAD, 2017). Outro estudo, conduzido na América do Norte em 2003, detectou naproxeno no efluente da Estação de Tratamento de Esgoto em uma cidade da Louisiana - EUA (81-106 ng L⁻¹) e nas águas superficiais dos rios Mississippi em Detroit e também em Ontário - Canadá (22-107 ng L⁻¹) (Boyd et al (2003). Essas regiões também já foram reportadas contaminações com ácido clofibríco (3-27 ng L⁻¹), ibuprofeno (até 34 ng L⁻¹), acetaminofeno (25-65 ng L⁻¹), cafeína (até 38 ng L⁻¹), naproxeno (até 135 ng L⁻¹), triclosan (9–26 ng L⁻¹), bisfenol A (até 147 ng L⁻¹) e carbamazepina (43–114 ng L⁻¹) (ZHANG et al., 2007).

Em cidades do estado de Nova York – EUA águas impactadas pela descarga de águas residuais, foram encontrados ciprofloxacina, sulfametoxazol e clindamicina (BATT; BRUCE; AGA, 2006). Nas águas superficiais de Charleston Harbor - EUA, resíduos de cafeína, cotinina e acetaminofeno foram detectados em 98,6%, 33,3% e 22,2% das amostras, respectivamente (HEDGESPETH et al., 2012; BLAIR et al., 2013).

No lago Michigan - EUA foram detectados 32 diferentes produtos farmacêuticos (incluindo metformina, cafeína, sulfametoxazol e triclosan), sendo a maioria (93%) encontrada no sedimento. Em águas de poço, na região de Massachusetts - EUA também já foi relatada presença de sulfametoxazol, fenitoína e carbamazepina em concentrações máximas de 113 ng L⁻¹, 66 ng L⁻¹ e 72 ng L⁻¹, respectivamente (SCHAIDER et al., 2014).

Em diferentes regiões da Ásia também tem sido encontrados resíduos farmacêuticos nos ecossistemas aquáticos. Uma comparação entre as águas do Delta do

Mekong – Vietnã com os do rio Tamagawa - Japão, apresentam maiores variedades e concentrações de antibióticos nesse último, com destaque para: sulfametoxazol, sulfapiridina, trimetoprim, eritromicina, azitromicina, claritromicina e roxitromicina em concentrações que variam de 4 a 448 ng L⁻¹ (MANAGAKI et al., 2007).

Em Patancheru – Índia, concentrações extremamente altas de produtos farmacêuticos como ciprofloxacina até 31 mg L⁻¹ foram medidas no efluente de uma ETE (LARSSON; DE PEDRO; PAXEUS, 2007), com relato de grave contaminação de superfície, solo e água potável (1,2 mg L⁻¹ de cetirizina e 6,5 mg L⁻¹ de ciprofloxacina) (FICK et al., 2009). Já na Coreia do Sul, estudos documentaram a presença de produtos farmacêuticos como hormônios e antibióticos em três grandes rios (Han, Nakdong e Youngsan), com destaque para resíduos de cimetidina, cafeína, acetaminofeno e sulfametoxazol (CHOI et al., 2008; KIM et al., 2007; SIM et al., 2011).

Na China, em água da torneira, água subterrânea, estação de tratamento de água e água do rio Fu-Hsing foram encontrados alguns resíduos farmacêuticos como ácido clofibrico, ibuprofeno, carbamazepina, naproxeno, cetoprofeno e diclofenaco (LIN; CHEN; DING, 2005; HU; ZHOU; LUO, 2010).

Considerando os países europeus, o diclofenaco é um dos produtos mais frequentemente encontrados nas bacias hidrográficas deste continente, sendo recentemente adicionado à Diretiva da União Europeia (UE) como substância prioritária para monitoramento (TIEDEKEN et al., 2017). Além desse fármaco, benzotriazol, cafeína e carbamazepina estão entre os resíduos mais identificados em rios de mais de 27 países europeus, com altos níveis de concentração (LOOS et al., 2009).

Na Itália, concentrações altas de ciprofloxacina (média de 251 ng L⁻¹) e sulfametoxazol (média de 127,2 ng L⁻¹) foram detectados nos efluentes de uma ETE (ZUCCATO et al., 2000; CALAMARI et al., 2003), enquanto medicamentos como carbamazepina, atenolol, metoprolol, sulfametoxazol, gemfibrozil e propranolol apresentam um alto grau de persistência em um rio na Suécia (BENDZ et al., 2005).

Na Alemanha, Hirsch e colaboradores investigaram a ocorrência de 18 antibióticos em efluentes de estação de tratamento de água, sendo o sulfametoxazol detectado em todas as dez amostras em até 2 µg L⁻¹ (HIRSCH et al., 1999). Outros estudos evidenciaram a presença de carbamazepina, diclofenaco, ibuprofeno, propranolol, bem como uma variedade de antibióticos e reguladores lipídicos em amostras de água de estação de tratamento e rios municipais alemães. Mais de 80% dos

medicamentos foram detectáveis em pelo menos um efluente, sendo que as concentrações de carbamazepina chegaram em até $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$ (TERNES, 1998; FERRARI et al., 2004; WIEGEL et al., 2004).

A carbamazepina também foi o produto farmacêutico que apresentou as maiores concentrações durante toda variação sazonal em águas residuais do rio Rakkolanjoki e do lago Haapajarvi, no leste da Finlândia (as maiores concentrações 556 ng L^{-1}) (MEIERJOHANN; BROZINSKI; KRONBERG, 2016). Na Espanha, multiclasses de resíduos farmacêuticos, seus metabólitos ativos e produtos de transformação foram evidenciados na bacia do rio Ebro, sendo os resíduos mais frequentes: carbamazepina (cujo metabólito 10,11 epoxi-carbamazepina apresentou maior concentração; $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$), claritromicina, sulfadiazina, propranolol e ácido salicílico (LÓPEZ-SERNA; PETROVIĆ, 2012).

Em Portugal, compostos farmacêuticos ativos principalmente de anti-inflamatórios não esteroides foram detectados em efluentes de cinco estações de tratamento de água (SALGADO et al., 2010). De maneira similar, no Reino Unido, contaminações com micropoluentes, atribuídas principalmente à extensa descarga de efluentes de águas residuais tratadas nos rios, incluem: anti-inflamatórios/analgésicos (tramadol, codeína, paracetamol, naproxeno, ibuprofeno e diclofenaco), antibacterianos (eritromicina, trimetoprim e amoxicilina) e antiepiléticos (gabapentina e carbamazepina) (RICHARDSON; BOWRON, 1985; KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2008).

3.2 ORIGEM, VIAS DE INSERÇÃO E DESTINO NO MEIO AMBIENTE

A entrada dos produtos farmacêuticos no meio ambiente pode seguir diferentes rotas, incluindo as vias hospitalar, residencial, industrial, pecuária, aquicultura, agricultura (Figura 1). As três principais rotas de entrada que representam um risco para o meio ambiente são através do tratamento de efluentes incompleto das indústrias farmacêuticas e hospitais, pelo descarte incorreto de medicamentos e embalagens, e pelo o esgoto doméstico (BILA; DEZOTTI, 2003).

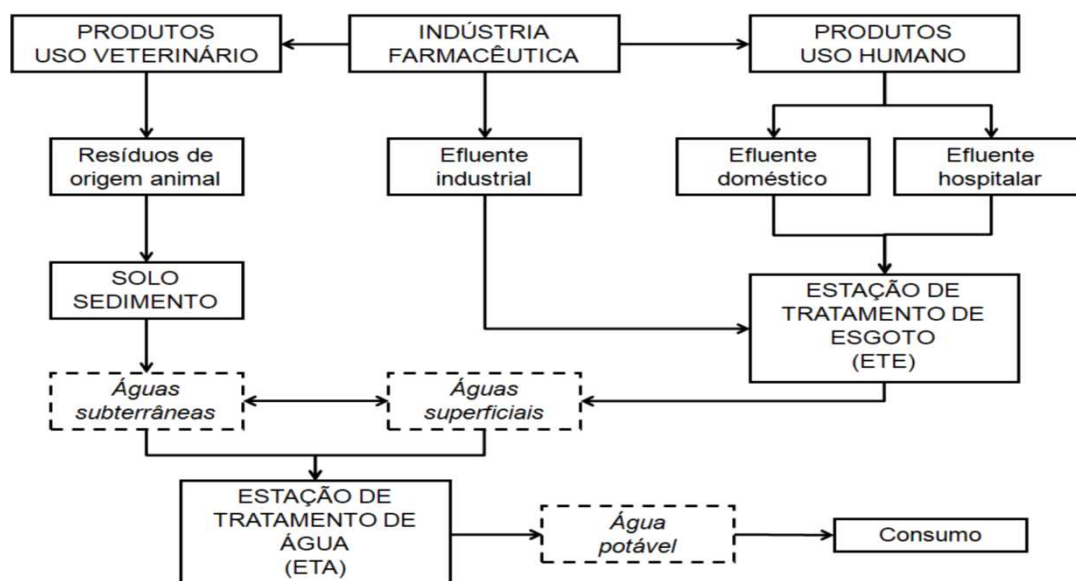


Figura 1. Principais vias de inserção dos micropoluentes de origem farmacêutica em cursos d'água. Fonte: BÖGER (2018).

No Brasil, indústrias farmacêuticas e hospitais devem tratar individualmente suas águas residuais. Após o tratamento, essa água residual se junta aos efluentes municipais (TORRES et al., 2012; STARLING; AMORIM; LEÃO, 2019). Entretanto, a legislação vigente no país é limitada, e o tratamento exigido engloba poucos parâmetros físico-químicos (BÖGER et al., 2018; VERAS et al., 2019). Efluentes de indústrias contendo subprodutos e líquido de lavagem gerados durante os processos de fabricação são uma fonte pontual significativa de produtos farmacêuticos no ambiente.

Medicamentos comprados em excesso ou vencidos são muitas vezes descartados de maneira incorreta através de ralos ou/e junto a resíduos sólidos domésticos urbanos, sendo uma outra rota importante de entrada de produtos farmacêuticos em estações de tratamento de águas residuais, aterros sanitários ou até diretamente no meio ambiente (ex. águas subterrâneas podem ser poluídas através da lixiviação de solos, aterros e fertilizantes de lodo) (RICHARDSON; BOWRON, 1985; BILA; DEZOTTI, 2003; SLACK; GRONOW; VOULVOULIS, 2004; METZGER, 2004; KÜMMERER, 2008; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2009).

Na maioria dos países, a devolução de medicamentos não utilizados ou vencidos a farmácias e indústrias ou outro processo de descarte seguro não é obrigatória (SLACK; GRONOW; VOULVOULIS, 2004). Entretanto, recentemente no Brasil o Decreto n. 10.388 de 6 de junho de 2020 da Presidência da República, institui o Plano

Nacional de Logística Reversa dos medicamentos domiciliares vencidos ou em desuso, o que apresenta um grande avanço para o país na área do saneamento.

Após os medicamentos (prescritos ou vendidos sem receita) serem administrados no hospital ou em casas para fins terapêuticos, os mesmos são metabolizados e os resíduos farmacêuticos são eliminados nas fezes e na urina como metabólitos ou na forma inalterada em quantidades variáveis.

Os produtos químicos resultantes da metabolização também podem ser mais ou menos ativos biologicamente do que a forma administrada (BILA; DEZOTTI, 2003). Os produtos farmacêuticos podem ser eliminados pelo organismo humano como conjugados (combinados com outros produtos químicos no corpo para torná-los solúveis em água), sendo esses, geralmente, biologicamente inativos. Porém, uma vez no ambiente, os produtos podem sofrer hidrólise e tornarem-se ativos novamente (HALLING-SØRENSEN et al., 1998). Esses resíduos (ativos e inativos) são levados pelos esgotos domésticos, chegam até as ETE, e se os medicamentos e seus metabólitos não forem completamente eliminados durante os processos de tratamento de esgoto, eles podem entrar no ambiente aquático e potencialmente alcançar a água potável.

As estações de tratamento de esgoto, na maioria das vezes, não apresentam tecnologia e estrutura física suficientes para a remoção eficaz de todos os produtos farmacêuticos ativos das águas residuais (BÖGER et al., 2018). Como resultado, os produtos farmacêuticos encontram seu caminho para o ambiente aquático, onde eles podem afetar diretamente organismos e incorporar-se às cadeias alimentares (CALIMAN; GAVRILESCU, 2009).

Além da presença do resíduo farmacêutico propriamente dito no ambiente, suas concentrações são influenciadas por propriedades físico-químicas como solubilidade, tempo de meia-vida, particionamento em solos e sedimentos (KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2004; WELLINGTON et al., 2013). A taxa de degradação é determinada por mecanismos complexos e pelas condições e interações ambientais. Antibióticos como sulfonamidas, tetraciclina e quinolonas, por exemplo, apresentam um tempo de meia-vida muito mais longa quando estão em sedimentos do que quando encontrados em água (BOXALL et al., 2003; KAY; BLACKWELL; BOXALL, 2004).

Quando o fármaco entra no meio ambiente aquático, ele pode aderir aos sedimentos ou sofrer degradação. As substâncias podem ser degradadas abioticamente via fotodegradação ou hidrólise, ou ainda bioticamente por meios de organismos

aeróbicos ou anaeróbicos. O pH também influencia na hidrólise química (EGGLETON; THOMAS, 2004). A biodegradação na água ocorre principalmente na estação de tratamento de esgoto, porque nas águas superficiais os microrganismos são dispersos e diversos. Muitos pesquisadores provaram estabilidade de antibióticos nas águas superficiais através de testes de laboratório (KÜMMERER, 2008). Além da biodegradação, existem também muitos outros mecanismos de eliminação, como fotodegradação, hidrólise e termólise. No estudo de (GAVALCHIN; KATZ, 1994), cinco dos antibióticos testados desapareceram após a incubação a 30 °C em comparação com outros dois antibióticos a 4 °C.

3.3 IMPACTOS AMBIENTAIS

Os produtos farmacêuticos são projetados para atividades biológicas específicas, com objetivo de diagnosticar, prevenir, curar ou aliviar sintomas (MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017). Entretanto, os medicamentos podem também provocar perturbações indesejadas nos sistemas bioquímicos de organismos vivos, resultando em efeitos ecotoxicológicos e eventos adversos (SANTOS et al., 2010; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017).

Pouco se sabe sobre o impacto da exposição de micropoluentes ou consumo de água potável contaminada com resíduos desses compostos medicamentosos na saúde humano à longo prazo. Muitos desses fármacos compartilham propriedades biológicas semelhantes, portanto, embora individualmente os níveis sejam baixos, quando agrupados por modos de ação os efeitos biológicos podem ser significativos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; SANTOS et al., 2010). Além disso, apesar da maior parte dos medicamentos ser aprovada para uso humano, os efeitos dessa exposição em populações sensíveis, como crianças e mulheres grávidas, também não foram elucidados. Os efeitos mais preocupantes e visíveis dos resíduos farmacêuticos são na regulação endócrina dos organismos vivos (ex. peixes) e no aumento da resistência microbiana a antibióticos (BILA; DEZOTTI, 2007; BÖGER et al, 2020).

3.3.1. Toxicidade ecológica

Desde dos primeiros relatos de resíduos farmacêuticos no meio ambiente na década de 1970, pesquisadores vem mostrando potenciais efeitos ecológicos dos medicamentos humanos e veterinários na água e solos (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

A maioria dos estudos avalia a mortalidade aguda de organismos de água doce, geralmente invertebrados como peixe e algas (COSTA et al., 2008). Em geral, os organismos marinhos são menos sensíveis aos efeitos dos resíduos quando comparados aos organismos de água doce, possivelmente devido às diferenças na sensibilidade das espécies e características físico-químicas dos meios de exposição (WHEELER et al., 2002; SANTOS et al., 2010).

Poucos são os estudos avaliando os efeitos crônicos dos resíduos farmacêuticos no ambiente (MIMEAULT et al., 2005; GALUS et al., 2013; VALDÉS et al., 2014; DU et al., 2016; COSTA et al., 2008; SANTOS et al., 2010). Entretanto, sabe-se que existem muitos parâmetros sub-letais crônicos associados a esses produtos como: efeitos transgeracionais na reprodução, crescimento, interação presa-predador e comportamento que podem influenciar significativamente a sustentabilidade ecológica. (BILA; DEZOTTI, 2007; SANTOS et al., 2010; CHITESCU; LUPOAE; ELISEI, 2016; DU et al., 2016).

Apesar de a maioria dos resíduos farmacêuticos estar presentes no ambiente em concentrações baixas, para exercer efeitos adversos significativos nos receptores ecológicos, é provável que outros compostos biologicamente ativos existam em níveis inferiores aos limites de detecção de técnicas analíticas atuais. Além disso, pouco se sabe sobre as consequências tóxicas de combinações de micropoluentes múltiplos (SANTOS et al., 2010; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017).

Na literatura, é possível encontrar alguns estudos avaliando a toxicidade ecológica de diferentes classes de medicamentos. O fármaco carbamazepina já foi associado à desregulação endócrina ao inibir a formação de pupas de *Chironomus* por diferentes mecanismos (KÜMMERER, 2008). Esse medicamento também foi definido como um inibidor de histona desacetilases (HDAC), as quais são fatores importantes na regulação da expressão gênica (BEUTLER et al., 2005). Além disso, na Argentina (rio Suquia - Córdoba) foi encontrada bioacumulação de carbamazepina e atenolol em

peixes (*Gambusia affinis*) em ambientes com concentrações próximas às encontradas em águas superficiais (média de bioacumulação para carbamazepina de 0,7 a 0,9 L kg⁻¹ enquanto para o atenolol foi de 0,08 a 0,13 L kg⁻¹) (VALDÉS et al., 2014). Outros estudos evidenciam fitotoxicidade significativa (abaixo de 1000 µg L⁻¹) associada à três classes de antibióticos (fluoroquinolona, sulfonamida e tetraciclina) (BRAIN et al., 2004).

3.3.2. Toxicidade humana

É inquestionável a melhoria na qualidade de vida das pessoas com o advento dos medicamentos utilizados, por exemplo, na prevenção e tratamento de doenças em humanos e animais, assim como para a melhoria da produção de alimentos. Contudo, estudos mostram, que uma vez no ambiente, esses compostos podem ser nocivos, sendo que alguns são conhecidamente carcinogênicos, mutagênicos e até teratogênicos (JONES; LESTER; VOULVOULIS, 2005).

A exposição contínua, mesmo que em baixas concentrações, de fármacos existentes em água pode representar riscos para a saúde humana, especialmente considerando algumas propriedades físico-químicas destes produtos (p. ex. meia-vida elevada, potencial de bioacumulação), que permite sua maior permanência no meio ambiente (JONES; LESTER; VOULVOULIS, 2005).

O consumo inconsciente desses resíduos por parte da população tem sido associado à eventos adversos, potencial carcinogênico, aumento da resistência à antimicrobianos e desregulação endócrina (HEBERER, 2002a; FERRARI et al., 2004).

3.3.3. Resistência

Desde a década de 1980, tem sido reportada aumento da resistência a antibióticos a partir da avaliação em diferentes corpos d'água. Fontes de bactérias resistentes a antibióticos no ambiente podem provir de efluentes de ETE (KÜMMERER, 2004; IWANE et al., 2007; MANAIA, 2017). Segundo Baquero e colaboradores (2008), existem os chamados reservatórios genéticos, locais potenciais para trocas genéticas e, conseqüentemente, para a disseminação da resistência antimicrobiana devido à alta conectividade biológica e à presença de seleção específica.

Entre esses reservatórios, encontram-se os efluentes domésticos e hospitalares. A presença de bactérias resistentes no esgoto depende, portanto, da estação de tratamento de esgoto, da população bacteriana estudada, do agente antimicrobiano e da concentração do mesmo (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008)

Guardabassi e colaboradores (1998) analisaram cepas de micro-organismos frente aos antibióticos amoxicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol, gentamicina e ciprofloxacina. Os pesquisadores evidenciaram frequências significativas de bactérias resistentes em corpos hídricos receptores antes e após o despejo de esgoto hospitalar e de indústria farmacêutica. Em estudos anteriores, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às drogas imipenem, meropenem, gentamicina, ciprofloxacina, cefepime, ticarcilina-ácido clavulânico, amicacina, ceftazidima e piperacilina-tazobactam, foram detectados em amostras de efluentes hospitalares no Brasil (GUARDABASSI et al., 1998; FUENTEFRIA; FERREIRA; CORÇÃO, 2011).

Em outras pesquisas, foi possível elucidar a composição e a persistência de populações de coliformes fecais e *Enterococcus* no esgoto de diferentes estações de tratamento. Observou-se que o tratamento do esgoto nessas estações, realizado com sistema de lodo ativado, não foi capaz de reduzir para níveis seguros as densidades destas bactérias resistentes a antibióticos (VILANOVA et al., 2004; VILANOVA; BLANCH, 2006). Esses dados mostram que bactérias resistentes à antimicrobianos são lançadas frequentemente em corpos d'água, contribuindo para a disseminação dos mecanismos de resistência no ambiente. O estudo de Yang e colaboradores (2009) confirmou que altas taxas de resistência para os fármacos ampicilina, ampicilina-sulbactam, imipenem, cefazolina, cefuroxima, gentamicina e amicacina, foram encontradas entre as cepas de populações bacterianas provenientes de esgoto hospitalar (YANG et al., 2009).

3.3.4 Desregulares endócrinos

Os desreguladores endócrinos têm recebido uma atenção especial uma vez que são substâncias químicas relacionadas ao comprometimento do sistema endócrino de animais e de humanos através da interferência direta ou indireta no sistema hormonal. Considerando que os hormônios são potentes moduladores do funcionamento bioquímico e fisiológico, a ocorrência de condições patológicas, como disfunção

reprodutiva e câncer, podem estar correlacionadas a estes micropoluentes (TERNES et al., 1999; SLACK; GRONOW; VOULVOULIS, 2004; GHISELLI; JARDIM, 2007; CALIMAN; GAVRILESCU, 2009; FATTA-KASSINOS et al., 2011)

Os desreguladores endócrinos contemplam um vasto grupo de compostos químicos e podem ser classificados pela sua origem em naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênicos) e sintéticos (hormônios sintéticos, metais, pesticidas, herbicidas, fungicidas e bisfenol A) (EBELE; ABOU-ELWAFI ABDALLAH; HARRAD, 2017). Ainda, podem ser classificados de acordo com a sua ação em agonistas (mimetizando a ação de hormônios), antagonistas (bloqueando a ação dos mesmos) ou moduladores (alterando a síntese, metabolismo e os níveis de receptores correspondentes) (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Na saúde humana, há evidências de que a disfunção no sistema endócrino pode acarretar declínio na qualidade do sêmen (havendo redução número e na mobilidade do espermatozoides), alterações no sistema reprodutor feminino (irregularidade no ciclo menstrual, endometriose e ovários policísticos), disfunção da tireoide e alguns tipos de cânceres (câncer de mama, ovário, próstata e testículo) desencadeados por mutações durante a síntese de DNA (SANTOS et al., 2010; DE AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

Ademais, a exposição a estas substâncias durante a fase fetal e infância está associada a um maior risco de alterações fisiológicas permanentes que não são encontradas em adultos quando expostos aos mesmos níveis. Isso ocorre porque alguns desreguladores endócrinos conseguem atravessar a barreira placentária e também a barreira hemato-encefálica (BILA; DEZOTTI, 2007).

3.4 LEGISLAÇÃO INTERNACIONAL E NACIONAL

A Conferência Internacional sobre Harmonização de Produtos Farmacêuticos para uso humano, recomenda que todos os novos medicamentos passem por uma avaliação de riscos ambientais. Essas avaliações já são conduzidas para todos os novos medicamentos veterinários, e espera-se que isso também seja, em breve, obrigatório para medicamentos de uso humano. Diretrizes específicas para procedimentos de avaliação de riscos ambientais já estão implementadas nos Estados Unidos, na União

Europeia e no Canadá, enquanto em países como Japão e Brasil as ações ainda são escassas. Com relação especificamente as normativas de qualidade das águas, ainda há limitações e dificuldades em se estabelecer as concentrações seguras para os principais fármacos. A maior parte das regulamentações refere-se a hormônios (BÖGER et al, 2015; ICH, 2020).

Cada país tem uma legislação referente à qualidade da água e do tratamento de efluentes e dentro do próprio país esses parâmetros podem ter variações com valores de referências restritivos aplicados pelos estados. Em 2006, a European Medicines Agency (EMA) elaborou um guia denominado *Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medical Products for Human Use*, em que há descrição dos riscos ambientais de produtos utilizados na medicina humana. O guia está embasado na Diretiva 2001/83/EC (*European Commission*). Adicionalmente, em 2013, a União Europeia publicou a Diretiva 2013/39/UE estabelecendo o monitoramento de diclofenaco, 17-beta-estradiol, e 17-alfa-etinilestradiol. Esse monitoramento é obrigatório para todos os países que compõem o bloco europeu, e seu objetivo é a coleta de dados e informações para facilitar a determinação das medidas adequadas e quais níveis podem ser considerados seguros para o consumo humano de águas.

Nos Estados Unidos da América, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) vem monitorando desde 1996 contaminantes presentes na água potável que não possuem regulamentação estabelecida na Lei de Água Potável Segura (SDWA). Algumas substâncias já são monitoradas como hormônios 17- β -estradiol, 17- α -etinilestradiol, 16- α -hydroxiestradiol, equilin, estrona, testosterona e 4-androstene-3,17-dione. Esse monitoramento tem como objetivo fornecer à EPA dados sobre a ocorrência desses contaminantes na água potável, o número de pessoas potencialmente expostas e uma estimativa dos níveis dessa exposição (BÖGER et al, 2015).

No Brasil, dentre as legislações existentes para controle da qualidade das águas destacam-se as leis do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que classifica os corpos de água, condições para lançamentos de efluentes e controle e de qualidade da água e potabilidade. A legislação mais recente sobre a qualidade da água para consumo humano é a Portaria de Consolidação nº 5 de 03/10/2017 anexo XX. Nela são listados os parâmetros aceitáveis para a água potável de consumo humano.

Entretanto, não foi incluído nessa portaria nenhum monitoramento de micropoluentes de origem farmacêutica.

3.5 FERRAMENTAS DE MONITORAMENTO

A complexidade do desenvolvimento analítico deve-se às interações complexas entre resíduos farmacêuticos, partículas sólidas e materiais orgânicos presentes nas matrizes aquosas. Uma extração, um *clean-up* e uma avaliação da matriz adequada geram resultados mais fidedignos na detecção e quantificação por espectrometria de massa. A qualidade dos resultados analíticos também depende dos primeiros passos do procedimento analítico, isto é, amostragem, condicionamento e armazenamento das amostras.

3.5.1 Condicionamento e armazenamento

Primeiramente, a amostragem da água a ser analisada deve ser feita em recipiente de vidro âmbar para evitar a interação dos resíduos farmacêuticos com plástico (FERREIRA; MÖDER; LAESPADA, 2011) ou a fotodegradação de moléculas como fluoroquinolonas (THIELE-BRUHN, 2003).

Durante o armazenamento, a atividade bacteriana deve ser interrompida para preservar a integridade da amostra (ou seja, forma física e composição química) (WILGA; KOT-WASIK; NAMIEŚNIK, 2008). Para matrizes biológicas como águas superficiais, a agência norte-americana EPA recomenda armazenar amostras a uma temperatura inferior a 10 °C, e iniciar a extração em até sete dias após a coleta, sendo idealmente preconizado em até 48 horas (EPA, 2007).

3.5.2 Procedimentos de extração e limpeza

A melhor técnica de extração deve fornecer extração seletiva de analitos farmacêuticos, ou seja, a maior recuperação de analitos e baixa extração de impurezas da matriz. Além disso, a técnica deve ser rápida, fácil, reprodutível e econômica, exigindo o uso mínimo de solvente orgânico (HERRERO et al., 2014; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015).

A limpeza é uma etapa importante na análise de produtos farmacêuticos, porque eles estão presentes em concentrações muito baixas em matrizes ambientais. Esta etapa leva à remoção de algumas das impurezas co-extraídas, reduz o efeito da matriz e diminui a sujeira em equipamentos analíticos, os quais podem diminuir consideravelmente os limites de detecção e quantificação. Logo, há a necessidade de uma etapa de limpeza adequada para reduzir interferências matriciais e melhorar os limites de detecção (HERRERO et al., 2014; PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015).

A extração em fase sólida (SPE) que usa um sorbente com características hidrofílico e lipofílico (HBL) é claramente a técnica de purificação mais frequentemente empregada (PETROVIĆ et al., 2005; BÖGER et al, 2020). Apesar de serem reportadas algumas perdas de analito durante a etapa SPE, é possível melhorar a performance da análise ao lidar com substâncias em concentrações de traços (SOSA-FERRERA; MAHUGO-SANTANA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2013).

Cartuchos HLB apresentam vantagens em análise multirresíduos, uma vez que os resíduos farmacêuticos polares e não polares, se forem neutros, podem se ligar no extrato (LARIVIÈRE et al., 2017). A amostra percola através do cartucho e os analitos são pré-concentrados para a próxima etapa, conhecida como eluição. Após serem eluídos, os analitos são analisados (BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018).

3.5.3 Técnicas hifenadas

Técnicas hifenizadas para análise de moléculas orgânicas são compostas de uma separação (cromatografia) seguida de um detector. O objetivo é separar um produto farmacêutico, contido na matriz, de outros, para que a detecção possa ser mais específica, visto que nem todos os tipos de detectores apresentam grande seletividade (HALLER et al., 2002).

A combinação das duas técnicas deve ser capaz de fornecer um método de análise qualitativa seletiva, com sensibilidade e reprodutibilidade adequados em matrizes ambientais. A escolha de uma técnica hifenizadas adequada é determinada pelas moléculas que serão analisadas ao invés do tipo de matriz (LARIVIÈRE et al., 2017).

3.5.3.1 Técnicas de separação

As duas técnicas mais usadas para separação de substâncias são cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e cromatografia gasosa (GC). Entretanto, como os compostos farmacêuticos geralmente não são voláteis, a técnica de GC é menos empregada. Para GC, a derivatização pode ser utilizada para melhorar volatilidade, porém alguns produtos farmacêuticos não têm hidrogênio ativo e não sofrem siliilação. Hormônios estrogênicos são a única família a ser separada mais facilmente por GC, e HPLC após uma derivatização (ALBERO et al., 2014; MACHADO et al., 2016).

No HPLC, parâmetros como fase estacionária, a natureza e o gradiente da fase móvel podem ser otimizados. Para a análise de muitos resíduos farmacêuticos, a fase estacionária geralmente empregada é a reversa (octildecano-silano) que fornece melhor resolução para cada analito, mesmo com polaridade e propriedades muito diferentes (FERRER; THURMAN, 2012; CHEN et al., 2013; SOSA-FERRERA; MAHUGO-SANTANA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2013). Na maioria das vezes, a fase é um gradiente da combinação de um solvente orgânico com a água e alguns aditivos, como ácidos ou sais. O pH da fase móvel não deve estar muito próxima do pKa dos analitos (HALLER et al., 2002; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2009). O ácido acético é comumente usados para obter o pH da fase móvel entre 2,5 e 4,0 para análise multirresíduos farmacêuticos (WIEGEL et al., 2004; OETKEN et al., 2005; FERRER; THURMAN, 2012). O ácido fórmico fornece uma melhor sensibilidade para detecção em um espectrômetro de massas (FERRER; THURMAN, 2012; BERLIOZ-BARBIER et al., 2014). O formiato de amônia pode ajudar a reduzir a largura dos picos e consequentemente melhorar a resolução de cada composto e a seletividade da técnica (LARIVIÈRE et al., 2017).

3.5.3.2 Dispositivos de detecção

Técnicas como detecção de luz ultravioleta (UV) e fluorescência (FLD) podem ser utilizadas para determinação de produtos farmacêuticos, especialmente após a separação por HPLC (LARIVIÈRE et al., 2017). Entretanto, existem limitações a essas técnicas para análise multirresíduos. A reduzida seletividade pode levar a erros de falsos positivos. Consequentemente, essas técnicas são frequentemente substituídas por

espectrometria de massas (MS), a qual pode ser utilizada com diferentes tipos de fontes de ionização (LARIVIÈRE et al., 2017).

Detecção por MS é baseado na ionização de produtos farmacêuticos eluídos e na detecção dessas espécies de fragmentos de íons caracterizados pela razão de massa/carga (m/z) (SAGRISTÀ et al., 2010). A fragmentação pode acontecer no modo negativo ($[M - H]^-$) ou no modo positivo ($[M - H]^+$). Geralmente, o modo de ionização escolhido para um fármaco se dá pelo seu pK_a , porém compostos como cetoprofeno ($pK_a = 4,45$) não seguem esse pressuposto (BARRON; TOBIN; PAULL, 2008).

O desempenho analítico é caracterizado pelos limites de detecção e quantificação instrumental (respectivamente, LoD e LoQ), que vão variar de acordo com a sensibilidade do aparelho em detectar os íons. Um LoQ instrumental alto pode ser o resultado de uma ionização ruim (RADJENOVIC et al., 2009; HERNÁNDEZ et al., 2014; LARIVIÈRE et al., 2017). No que diz respeito à técnica de ionização, o impacto de elétrons (EI) é mais usado no GC. Para técnica de HPLC, a ionização por electropulverização (ESI) é frequentemente preferida à ionização química por pressão atmosférica (APCI), pois fornece melhor sensibilidade (IWANE et al., 2007; SOSA-FERRERA; MAHUGO-SANTANA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2013; DE JESUS GAFFNEY et al., 2014; CHITESCU; LUPOAE; ELISEI, 2016; BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018; GALINDO-MIRANDA et al., 2019).

Alguns procedimentos analíticos empregados para determinação dos fármacos nas amostras líquidas podem ser encontrados na literatura (RODRIGUEZ-MOZAZ; LOPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2007; SOSA-FERRERA; MAHUGO-SANTANA; SANTANA-RODRÍGUEZ, 2013; DE JESUS GAFFNEY et al., 2015; RADOVIC et al., 2015; CHITESCU; LUPOAE; ELISEI, 2016; BISOGNIN; WOLFF; CARISSIMI, 2018; GALINDO-MIRANDA et al., 2019). Esses estudos mostram diferentes tipos de cartuchos com sorventes para uma ampla faixa de polaridade de analitos. Porém, todos utilizaram separação por cromatografia, com o predomínio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector por espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS).

3.5.4 Efeitos matriciais

Uma das maiores desvantagens de análise farmacêutica em matrizes ambientais por cromatografia líquida acoplada ao espectrometro de massas (HPLC-MS) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas (GC-MS) é supressão ou aumento dos sinais do analito por substâncias presentes previamente na amostra (RADJENOVIC et al., 2009). Comparado com outras técnicas como fluorescência e ultra-violeta, o desenvolvimento de métodos por MS deve incluir a determinação de efeito matriz e, conseqüentemente, corrigir resultados para fornecer quantificação precisa (WAGIL et al., 2015).

Algumas soluções analíticas podem ser tomadas para reduzir efeitos matriciais, como por exemplo adição de acetonitrila que faz uma melhor extração frente ao metanol, porque minimiza os compostos matriciais (CHAMBERS et al., 2007). Outra técnica usada é a adição de um padrão interno antes da extração, ou seja, fortificar a matriz com padrões. Isso permite que o efeito matriz e as perdas durante a preparação da amostra sejam corrigidas simultaneamente (WAGIL et al., 2015; LARIVIÈRE et al., 2017).

Análises da curva de calibração também podem ser úteis para desenvolvimento do melhor método de detecção. A curva de calibração é feita diluindo as soluções padrões em um extrato de matriz branco. Porém, há a dificuldade de encontrar matrizes ambientais isentas de quaisquer produtos farmacêuticos de interesse (GOSETTI et al., 2010; NORAMBUENA; GRAS; CONTRERAS, 2013). Nesse contexto, a análise dentre os slopes da curva de calibração em extrato de matriz e em solução isenta é frequentemente usada para corrigir o efeito matriz (SCHLÜSENER; SPITELLER; BESTER, 2003; AZZOUZ; BALLESTEROS, 2012), especialmente se a matriz em branco tiver a mesma ou uma composição muito semelhante à amostra ambiental a ser analisada. Isso permite uma maior confiabilidade nos resultados (GOSETTI et al., 2010).

Considerando que soluções analíticas são frequentemente combinadas, diluições de extratos são realizados para minimizar a quantidade de compostos previamente existentes na amostra (AGA et al., 2005). Radjenovic e colaboradores (2009) realizaram diluições sucessivas e consideraram a diluição adequada para compensar o efeito matriz, quando sinais no extrato fortificado e com solvente fortificado mostraram uma diferença

menor de 20%. Duas diluições foram suficientes para diminuir significativamente o efeito matriz nos extratos ambientais sem diminuir a sensibilidade da quantificação (RADJENOVIĆ et al., 2009). Outros autores (BOURDAT-DESCHAMPS et al., 2014; LARIVIÈRE et al., 2017) sugerem usar a estratégia de diluição de no máximo de 10 vezes para limitar a perda de sensibilidade durante análise.

3.5.5 Validação

Segundo o documento orientativo da *European Commission Decision* 2002/657/EC (*Commission Decision* 2002) e a ICH (2005) o objetivo de uma validação é confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido. Deve-se realizar a análise de alguns parâmetros, tais como seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão com amostras controle e amostras fortificadas para se determinar o desempenho analítico. Entretanto, não há recomendações disponíveis para validação analítica direcionada unicamente para micropoluentes em matrizes ambientais (TUC DINH et al., 2011b; MONTEIRO et al., 2018).

A avaliação da linearidade estabelece a faixa linear no equipamento. Entretanto, é necessário verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a referida faixa linear, visando assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta da técnica. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada pela expressão matemática (equação da reta) usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (EUROPEAN COMMISSION, 2002; ICH, 2005).

A seletividade é a capacidade que o método analítico possui para medir um composto em presença de outros componentes como impurezas e componentes da matriz, ou seja, refere-se ao sinal analítico isento de interferências. Caso a seletividade não seja assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão poderão ficar comprometidas. Nas análises ambientais, esse parâmetro é, muitas vezes, analisado no efeito matriz (RODRIGUEZ-MOZAZ; LOPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2007; TUC DINH et al., 2011b; FERRER; THURMAN, 2012; GALINDO-MIRANDA et al., 2019).

O Limite de Detecção (LoD) se aplica quando se realiza alguma medida em amostra com baixa concentração do analito ou em análise de traços. É importante se conhecer qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. Existem diversas formas de se calcular o LoD, sendo a mais comum é a relação sinal/ruído de 3:1. O método visual também pode ser utilizado para determinar o LoD através de soluções padrões do analito em diluições sucessivas a partir do primeiro ponto da curva de calibração, observando-se a primeira concentração a ser detectada visivelmente. Já o Limite de Quantificação (LoQ) é a primeira concentração quantificável com precisão e exatidão, e pode ser calculado pela a relação sinal/ruído de 10:1 (EUROPEAN COMMISSION, 2002; ICH, 2005).

As formas mais comuns de se expressar a precisão são por repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, as quais são, em geral, expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (CV, expresso em %) ou pelo desvio padrão relativo (DPR). A repetitividade deve seguir as seguintes condições: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível (EUROPEAN COMMISSION, 2002; ICH, 2005).

Já a precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando-se o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo-se exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (EUROPEAN COMMISSION, 2002; ICH, 2005).

A exatidão de um método analítico permite avaliar a proximidade entre o valor obtido pelo método de análise e o valor de referência convencionalmente aceito como verdadeiro. Este parâmetro, que está dependente de erros sistemáticos, pode ser estimado com base em análise de substâncias padrões (EUROPEAN COMMISSION, 2002; ICH, 2005).

3.6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS

Vários métodos podem ser usados para testar a suscetibilidade de microrganismos aos antibióticos. No geral eles se baseiam em determinar a

concentração inibitória mínima de um antimicrobiano (CIM) capaz inibir o crescimento visível de um microrganismo em um teste após 18 a 24 horas de incubação. O Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) fornece as diretrizes mais populares, baseadas em propriedades farmacocinéticas-farmacodinâmicas (PK-PD) e mecanismos de resistência (KHAN; SIDDIQUI; PARK, 2019).

A maioria dos países europeus segue os pontos de corte da CIM baseados nas propriedades da PK-PD. Os pontos de corte epidemiológicos (ECOFFS), são realizados conforme determinado pelo Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST). Os pontos de interrupção do CIM recomendados pela CLSI geralmente são mais baixos que os da EUCAST (KASSIM et al., 2016; KHAN; SIDDIQUI; PARK, 2019).

O método de difusão em disco é considerado o padrão-ouro para confirmar a suscetibilidade de bactérias. A difusão de disco foi criada pelos experimentos de Bauer e Kirby em 1956, em que a colônia bacteriana isolada é selecionada, suspensa no meio de crescimento e padronizada através de um teste de turbidez. A suspensão padronizada é inoculada na placa de ágar solidificado e o papel tratado com antibiótico é colocado sobre a placa inoculada. A difusão do antibiótico do disco através do ágar solidificado resulta na formação de uma zona de inibição cujo tamanho pode ser mensurado, correspondendo à concentração de antibiótico (KHAN; SIDDIQUI; PARK, 2019).

A difusão em disco é amplamente utilizada em testes rotineiros de suscetibilidade, fornecendo um protocolo simples e econômico para a detecção de vários alvos. No entanto, juntamente com essas vantagens, essa técnica se mostra impraticável e demorada para análises ambientais (KHAN; SIDDIQUI; PARK, 2019) (WATKINSON et al., 2007). Por isso, novos métodos como com ágar seletivo modificado impregnado com antibióticos com CIM pode ser uma alternativa para avaliar resistência nessas amostras (WATKINSON et al., 2007).

Os métodos genotípicos como reação em cadeia da polimerase (PCR) e Microarrays de DNA são geralmente atribuídos à detecção rápida, direta, sensível e específica de genes de resistência, porém também sofrem com sérias desvantagens que diminuem sua utilidade clínica, como por exemplo: a presença de um gene de resistência não garante a expressão dele para se ter uma bactéria resistente (KHAN; SIDDIQUI; PARK, 2019).

3.7 OPERAÇÕES UNITÁRIAS COMUMENTE EMPREGADAS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE EFLUENTES

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) utilizam processos primários e secundários para tratar o esgoto antes desse ser lançado em algum corpo de água. Esses tratamentos têm a capacidade de melhorar a qualidade da água antes de a mesma ser devolvida ao ambiente. Existem vários tratamentos convencionais de efluentes que são baseados em processos físicos, químicos e biológicos, sendo esse último o mais utilizado por conseguir tratar um maior volume de efluente, apresentarem eficiência na remoção de matéria orgânica e baixo custo (CLARA et al., 2005; RADJENOVIĆ et al., 2009).

O tratamento de efluentes é usualmente classificado de acordo com os seguintes níveis: preliminar; primário; secundário e terciário. O tratamento preliminar objetiva apenas a remoção dos sólidos grosseiros, enquanto o tratamento primário visa a remoção de sólidos sedimentáveis e parte da matéria orgânica. Em ambos predominam os mecanismos físicos de remoção de poluentes (SPERLING, 2005).

Já no tratamento secundário, no qual predominam mecanismos biológicos, o objetivo é principalmente a remoção da matéria orgânica e eventualmente predominantes, nitrogênio e fósforo (SPERLING, 2005). Nos processos biológicos, micro-organismos biotransformam ou alteram a estrutura da molécula através de um complexo enzimático (FISCHER; MAJEWSKY, 2014). São classificados em: aeróbicos (exemplo: lodos ativados, filtros biológicos, valos de oxidação e lagoas de estabilização); anaeróbicos (exemplo: reatores anaeróbios, fossas sépticas) (SPERLING, 2005). Dentre os diversos tipos de tratamento biológico conhecidos, destaca-se o sistema de lodos ativados (MELO et al., 2009; BRANDT et al., 2013; DE AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013).

O termo lodos ativado designa a massa microbiana floculenta que se forma quando esgotos e outros efluentes biodegradáveis são submetidos à aeração (Figura 2). A biofloculação vem de um estado fisiológico das células, não sendo um privilégio de uma espécie. O efeito que parece contribuir à biofloculação está ligado à excreção ou à liberação, após a lise das células, de polímeros ou polissacarídeos. Estas moléculas agem como polieletrólitos de síntese e sua parte fixa as células como um revestimento

aderente. Desta forma, em um floco de lodo, têm-se vários microrganismos presentes unidos por polímeros (SPERLING, 2005).

O princípio do lodo ativado é que, em um reator, uma comunidade de microrganismos é constantemente fornecida juntamente com a matéria orgânica e oxigênio. Os microrganismos consomem a matéria orgânica e transformam por meio de metabolismo aeróbio em biomassa microbiana nova e dióxido de carbono, água e minerais (SPERLING, 2005).

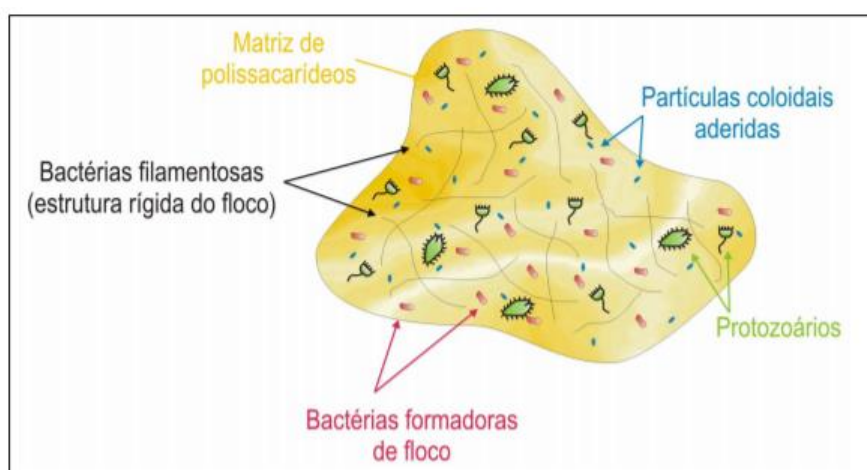


Figura 2. Esquema de um floco de lodo ativado. Fonte: SPERLING (2005).

Apesar dos processos biológicos alcançarem altas taxas de remoção de matéria orgânica, a taxa de biodegradabilidade de fármacos é baixa, na ordem de 50% para sistemas convencionais de lodo ativado (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; RADJENOVIĆ et al., 2009).

Sabe-se que a eficiência de remoção dos micropoluentes, farmacêuticos ou não, das estações de tratamento pode ser afetada por diversos fatores, como: as propriedades físico-químicas do fármaco, o tipo de tratamento empregado, o tempo de detenção hidráulica, as condições ambientais e a idade do lodo (BRANDT et al., 2013). Já a disponibilidade dos micropoluentes nos esgotos domésticos é influenciada por diversos fatores, como: presença de matéria orgânica, propriedades de sorção, distribuição, mobilidade e degradabilidade do composto. Sua remoção do esgoto vai depender das características lipofílicas e hidrofílicas, e afinidade pelo material em suspensão, a qual é estimada pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}). Espera-se que fármacos com elevado K_{ow} tenham um grande potencial de serem encontrados sorvidos nos sólidos

presentes em esgotos domésticos, e não na fase líquida do efluente (DE AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013)

A literatura científica reporta uma variabilidade nos resultados de remoção de micropoluentes em sistemas de tratamento, e essas diferenças repousam no fato de que o próprio processo de tratamento ainda não está completamente compreendido. Nas ETE, não se sabe ao certo se a remoção é devida à degradação biológica ou à capacidade de adsorção no lodo (BRANDT et al., 2013). Além disso, a geração de produtos intermediários, aliada às transformações químicas e biológicas presentes no sistema, é pouco abordada na literatura (ZORITA; MÅRTENSSON; MATHIASSEN, 2009; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017).

O tratamento terciário objetiva a remoção de poluentes específicos (usualmente tóxicos ou compostos não biodegradáveis) ou ainda, a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário (SPERLING, 2005). Alguns países já implantaram o tratamento terciário, que se refere ao reuso da água. Na Holanda, a etapa terciária de tratamento já é realizada desde 2002 (LUO et al., 2014). O tratamento terciário é bastante raro no Brasil (SPERLING, 2005).

3.7.1 Processos oxidativos avançados

Processos oxidativos avançados (POAs) são uma alternativa para o tratamento de efluentes que contém espécies resistentes frente aos processos biológicos utilizados nas rotinas convencionais de tratamento. Esses processos são baseados na formação de radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), espécie altamente oxidante, de vida curta, não seletivas e capaz de mineralizar inúmeros compostos orgânicos, convertendo-os em dióxido de carbono, água e sais orgânicos (MELO et al., 2009; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017).

Esse radical é formado por processos que podem ser classificados em sistemas homogêneos ou heterogêneos, conforme a ausência ou a presença de catalisadores na forma sólida, além de poderem estar ou não sob efeito da radiação (BABIC et al., 2017; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017). Dentro do contexto dos processos de oxidação avançada, a fotocatalise heterogênea (UV-TiO₂) se destaca como um dos sistemas mais exaustivamente estudados, principalmente no que diz respeito à degradação de poluentes orgânicos. Essa técnica pode representar uma alternativa para a

remoção de micropoluentes do ambiente (BABIC' et al., 2017; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017).

A desvantagem dos processos de oxidação avançada refere-se a sua capacidade de transformar algumas moléculas em metabólitos ativos. Muitos destes metabólitos possuem atividade biológica maior do que o ativo do qual se originou. Ainda, há a possibilidade de ocorrer a transformação de metabólitos secundários na molécula ativa (MELO et al., 2009).

4. CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO SPE - HPLC - MS/MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS FARMACÊUTICOS E APLICAÇÃO EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA DO IGUAÇU - BR E EM UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA

Publicado em: Beatriz Böger, Raquel de O. Vilhena, Mariana M. Fachi et al. HPLC-MS/MS method for quantification of pharmaceuticals in subtropical rivers and water treatment plants in Brazil. *Journal of Environmental Science and Public Health*, v. 4, p. 390-408, 2020

4.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o descarte e a ocorrência de compostos de origem farmacêutica em ambientes aquáticos têm ganhado mais atenção. Com isso, o interesse científico sobre o efeito e a detecção desses micropoluentes em águas superficiais aumentou significativamente (RIVERA-UTRILLA et al., 2013; DONNACHIE; JOHNSON; SUMPTER, 2016; ALVES; GIRARDI; PINHEIRO, 2017; TORRES et al., 2017). Embora a preocupação com a investigação de produtos de origem farmacêutica em águas superficiais tenha crescido em todo o mundo, existem poucos estudos apontando a ocorrência desses micropoluentes em rios urbanos no Brasil (AUS DER BEEK et al., 2016; IDE et al., 2017; ELLIOTT et al., 2018).

A maioria dos estudos feitos no Brasil investiga a ocorrência de produtos farmacêuticos que são consumidos intensivamente nas regiões desenvolvidas do mundo, principalmente na Europa e nos Estados Unidos da América. Além de usar protocolos e métodos analíticos que já estão bem estabelecidos nesses países. Além disso, é interessante notar, que cada região do Brasil apresenta padrões de consumo de medicamentos diferentes e estruturas de saneamento básico diferentes. Então, será difícil relacionar concentrações de micropoluentes presentes em diferentes regiões do Brasil, será mais ainda com países desenvolvidos (STARLING; AMORIM; LEÃO, 2019).

Embora não exista uma regulamentação brasileira atual que regule a presença de medicamentos nas águas superficiais, o monitoramento dessas substâncias e de seus metabólitos é essencial para garantir a qualidade, a biodiversidade e a saúde dos organismos que dependem da água (BILA; DEZOTTI, 2003; RIVERA-UTRILLA et al., 2013; AUS DER BEEK et al., 2016; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017).

De forma a contribuir com dados nacionais, neste estudo foi selecionada a Bacia do Alto Iguaçu que tem a nascente na Serra do Mar. O rio principal estende-se por aproximadamente 90 km até o limite da Região Metropolitana de Curitiba, com uma área de drenagem de cerca de 3.000 km². A população que mora sobre a bacia é de aproximadamente três milhões de habitantes, pertencentes a 14 municípios, concentrando 30% da população urbana do estado, com baixos índices de atendimento e tratamento de esgoto (SETTI et al., 2011; IDE et al., 2017).

A bacia do Alto Iguaçu está dividida em 26 sub-bacias principais. Os rios formadores da margem direita do Iguaçu, cortam a cidade de Curitiba e região metropolitana, recebendo toda a carga proveniente da poluição difusa e de efluentes domésticos e/ou industriais que contribuem para a poluição do rio Iguaçu (SETTI et al., 2011; IDE et al., 2017). Essa região é, portanto, a que necessita de maiores controles e monitoramento dos recursos hídricos e é onde se localizam os pontos de coleta desse estudo. Além disso, essa bacia tem diversos mananciais com alto potencial de abastecimento humano (LEITE; PERALTA-ZAMORA; GRASSI, 2011; IDE et al., 2017).

Na margem direita do Rio Iguaçu há três sub-bacias que estão inseridas dentro da paisagem de Curitiba: bacia do rio Atuba, do Belém e do Barigui. A primeira, tem como rio principal o rio Atuba que possui suas nascentes no município de Colombo, entrando ao norte de Curitiba e percorre 23 km dentro da cidade. Em seu trajeto recebe alta carga de esgotos domésticos devido à ocupação irregular de suas margens e falta de mata ciliar. Nas cabeceiras da sub-bacia do rio Atuba encontra-se parte da formação geológica que constitui o Aquífero Karst, um dos mananciais abastecedores de água potável da Região Metropolitana de Curitiba (RMC) (IAP, 2005).

A segunda sub bacia, o rio principal é o Belém que é um rio genuinamente curitibano, possui nascente e foz dentro da cidade de Curitiba, passando por 37 bairros e estando poluído na maior parte do seu trajeto. Apresenta-se altamente degradada devido a problemas como a falta de esgotamento sanitário e a presença de inúmeras moradias irregulares (SETTI et al., 2011; IDE et al., 2017).

A terceira tem o rio Barigui como principal, percorre 18 bairros dentro de Curitiba e sua bacia foi caracterizada pela grande quantidade e diversidade de indústrias, principalmente, devido à Cidade Industrial de Curitiba (CIC). O rio Barigui forma os lagos dos parques Barigui e Tingui, locais em que encontra-se mais preservado (SETTI et al., 2011; IDE et al., 2017).

Portanto, os objetivos deste capítulo foram desenvolver e validar um método analítico SPE – HPLC - MS/MS para investigar a ocorrência de resíduos farmacêuticos no rio Iguaçu e seus principais afluentes e para avaliar a remoção desses micropoluentes em uma estação de tratamento de água brasileira.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Seleção dos medicamentos

A escolha dos medicamentos a serem estudados foi baseada na priorização da lista de produtos farmacêuticos com riscos ecológicos para o meio ambiente apresentadas por alguns autores (DE VOOGT et al., 2009; JI et al., 2016; HAN; LEE, 2017). Um total de 25 medicamentos foram selecionados para o estudo, são eles: amoxicilina, azitromicina, acetaminofeno, aciclovir, atenolol, ciprofloxacino, cafeína, carbamazepina, captopril, cetoprofeno, cimetidina, diazepam, doxiciclina, enalapril, fluoxetina, glibenclamida, glimepiride, lidocaína, loratadina, metformina, norfloxacino, propranolol, sulfametaxazol, sibutramina e sulfadiazina.

4.2.2. Reagentes e insumos

Acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico (98%) e o formato de amônio (99%) foram adquiridos na Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação de água Milli-Q (Merck Millipore, Bedford, MA, EUA). Os padrões químicos de norfloxacin (99,8%) e ciprofloxacina (93,4%) foram adquiridos da Zhejiang Langhua Pharmaceutical Co. (Zhejiang, China). Doxiciclina (98,7%), amoxicilina (98%) e sulfametoxazol (99,5%) foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer (Baviera, Alemanha). A azitromicina (94,4%) foi adquirida da Alembic Pharmaceuticals Limited (Gujarat, Índia). Acetaminofeno (99,8%), sibutramina (94,4%), aciclovir (<98%), metformina (97,5%), atenolol (99,9%), cafeína (99,96%), carbamazepina (99,96 %), diazepam (99,96%) e fluoxetina (99,9%) foram fornecidos pela United States Pharmacopeia (Maryland, EUA). Padrões de captopril (<98%), cetoprofeno (<98%) e cimetidina (<99,5%), enalapril (<98%), glibenclamida (<99,6%), glimepirida (<98%), lidocaína (< 98%), loratadina (<98%), propranolol (<98%) e sulfadiazina (<98%) utilizados como padrão interno (IS) foram obtidos da Farmacopeia Brasileira (Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções estoques desses compostos foram preparadas com diferentes composições de metanol, água e acetonitrila com ácido fórmico e formato de amônio,

de acordo com a solubilidade de cada substância e armazenadas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e no escuro a uma concentração de $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, por um período máximo de 1 mês. As soluções de trabalho foram preparadas a fresco utilizando água e acetonitrila (50:50, v / v), contendo ácido fórmico a 0,1% e formato de amônio $5\text{ }\mu\text{M}$ como diluente de forma a se obter concentrações finais de 100, 10 e $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.3 Área de estudo

Foram coletadas amostras de águas superficiais durante a primavera de 2019 (n = 16) nos principais rios das quatro maiores bacias hidrográficas da cidade de Curitiba - Brasil. Os seis locais de amostragem selecionados foram (Figura 3):

- Ponto 1 - Rio Belém a 3,8 km da nascente do rio ($25^{\circ} 23' 17,1''\text{ S}$; $49^{\circ} 15' 59,9''\text{ W}$), amostra de água coletada na saída do lago do Parque São Lourenço;
- Ponto 2 - Rio Belém a 9,2 km da nascente do rio ($25^{\circ} 25' 13,1''\text{ S}$; $49^{\circ} 16' 09,5''\text{ W}$), amostra de água coletada na ponte da Avenida Cândido de Abreu;
- Ponto 3 - Rio Barigui ($25^{\circ} 25' 54,7''\text{ S}$; $49^{\circ} 18' 49,9''\text{ W}$), amostra de água coletada na saída do lago do parque Barigui;
- Ponto 4 - Rio Atuba ($25^{\circ} 22' 50,4''\text{ S}$; $49^{\circ} 12' 26,2''\text{ W}$), amostra de água coletada dentro do parque do Atuba;
- Ponto 5 - Rio Iguaçu ($25^{\circ} 35' 59,8''\text{ S}$; $49^{\circ} 23' 53,7''\text{ W}$), amostra de água bruta (afluente) coletada na Estação de Tratamento de Água Industrial de Iguaçu;
- Ponto 6 - Estação de Tratamento de Água Industrial de Iguaçu ($25^{\circ} 35' 59,8''\text{ S}$; $49^{\circ} 23' 53,7''\text{ W}$), amostra de água tratada (efluente) coletada.

Os pontos de amostragem foram realizados em locais de alto fluxo do rio. Uma amostra de água foi coletada em garrafas de vidro âmbar. As amostras foram mantidas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a chegada ao laboratório. Após a coleta, as amostras foram filtradas a vácuo através de uma membrana de fibra de vidro com tamanho de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e diâmetro de 47 mm (Millipore). O pH das amostras foi medido e ajustado para pH 6,5 após o processo de filtração.



Figura 3. Rios selecionados para os locais de coleta das amostras de água em Curitiba-Brasil. Fonte: Autora, 2020

4.2.4 Preparo de amostra

A SPE foi realizada em um manifold de extração (Milford, Massachusetts, EUA), utilizando cartuchos Phenomenex Strata-X® de 200 mg/3 mL (Torrance, Califórnia, EUA). Os cartuchos SPE foram condicionados com 4 mL de metanol e em seguida por 6 mL de água ultrapura. Duzentos e cinquenta mililitros de amostra de água foram pré-concentrados através do cartucho a uma taxa de fluxo constante de 10 mL min⁻¹. Posteriormente, os cartuchos foram secos ao ar por dois minutos e, na sequência, os analitos foram eluídos com 4 mL de metanol. As amostras em metanol foram evaporadas até à secura em um banho termostático a 30 ° C sob uma corrente de nitrogênio gentil. Os resíduos foram dissolvidos em 0,5 mL de fase móvel (água e acetonitrila a 50:50 v /v, contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 µM de formiato de amônio), resultando em um fator de concentração de 500 vezes. As amostras foram transferidas para vials e injetadas no HPLC- MS/MS.

4.2.5 Técnicas de análise e condições analíticas

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo a líquido Agilent 1200 HPLC (Wilmington, EUA), com um modelo de bomba binária G1312B, desgaseificador

G1379B e forno de coluna G1316B, em interface com um espectrometro de massas triplo quadrupolo da Applied Biosystems API 3200 equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) operada no modo positivo (ABSciex, Toronto, Canadá).

O HPLC foi conectado a um gerenciador de amostras CTC Sample Manager (Modelo 2777 Waters Corporation, Milford, EUA) operado a 5 ° C. O nitrogênio de alta pureza foi produzido usando um gerador de nitrogênio de alta pureza da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA) para o gás de interface (CUR), o gás de nebulização (GS1), gás auxiliar (GS2) e gás de colisão (CAD).

Inicialmente, todos os analitos foram preparadas a 500 ng mL⁻¹ usando diferentes concentrações de aditivos (formiato de amônio e ácido fórmico) em solução de água: acetonitrila (50:50, v /v) para as análises por infusão direta no espectrômetro de massa. Após estabelecer os aditivos e as concentrações da fase móvel, o experimento de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e análise por injeção em fluxo (FIA) foram realizados para otimizar as condições do analisador e da fonte de ionização, respectivamente.

As condições cromatográficas foram baseadas no estudo de FERRER; THURMAN (2012). A fase estacionária utilizada foi uma coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 com 4,6 mm × 150 mm e tamanho de partícula de 5 µm (Agilent, Milford, EUA). Diferentes composições da fase móvel e os modos de eluição em gradiente foram testados, com fluxo variando de 200 a 400 µL min⁻¹. O volume de injeção foi avaliado entre 10 e 20 µL e a temperatura do forno de coluna foi testada a 30, 35 e 40 ° C.

A condição ideal foi alcançada utilizando-se como fase móvel água (A) e acetonitrila/água 95: 5 (v/v) (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio usando uma eluição gradiente (10% de B inicial e rampa linearmente de 10% B a 100% B por 0-35 min), temperatura de forno de coluna a 30 ° C, fluxo 400 µL min⁻¹ e 20 µL volume de injeção. Para a limpeza da agulha de injeção foi utilizada uma solução de metanol/água (50:50, v/v). A aquisição e o processamento dos dados foram realizados com o software MS Workstation by Analyst, versão 1.4.2 (ABSciex, Toronto, Canadá).

4.2.6 Validação analítica

O método foi validado de acordo com os requisitos da Decisão 2002/657/CE da Comissão Europeia (Decisão 2002 da Comissão) e ICH (2005). Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), recuperação, precisão e exatidão. Todos os parâmetros de validação foram realizados usando uma mistura de matriz (água) de todos os pontos de coleta fortificados com concentrações conhecidas de analitos em estudo.

A seletividade foi determinada pela comparação da inclinação das curvas analíticas preparadas em matriz e da curva preparada em solvente. A matriz usada foram os extratos diluídos (5:1) fortificados com padrões e comparada com soluções de água ultra-pura fortificada para avaliar o efeito da matriz. Os resultados foram comparados pelo teste t de Student ($p < 0,05$ representando significância). Isso ocorreu porque nenhuma matriz semelhante foi encontrada sem os analitos.

A linearidade foi avaliada através da concentração de três curvas de calibração independentes, contemplando cinco níveis de concentração (em triplicata) na faixa de 10-60 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100-500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A linearidade foi determinada com base na regressão linear empregando mínimos quadrados, a partir da correlação entre resposta obtida no ensaio e a concentração analítica. Foram avaliadas a homocedasticidade das variâncias (teste de Brown-Forsythe), a normalidade residual (teste de Anderson-Darling) e significância do coeficiente angular (teste t). Todas as concentrações que estavam acima do ponto mais alto da curva de calibração foram diluídas e reanalisadas. Foi permitida variação de até 20% no desvio padrão relativo (DPR) para a precisão em cada nível. A detecção de instrumentação (LoD) e os limites de quantificação (LoQ) foram calculados usando a relação sinal/ruído de 3:10 (LoD, concentração do analito que produz um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento; LoQ, concentração do analito que produz um sinal de dez vezes a razão sinal/ruído do equipamento).

Para medir a eficiência de extração da SPE, as recuperações foram calculadas analisando amostras fortificadas com todos os analitos em nível médio (40 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 350 $\mu\text{g L}^{-1}$) em água e matriz. A exatidão foi calculada como o erro relativo (ER) também no nível médio. A precisão intra-dia foi estabelecida através da análise de seis réplicas em três níveis em um dia e a precisão inter-dia foi verificada por determinações

em dias diferentes e por dois analistas diferentes. Os resultados foram avaliados pelos DPR, teste t de Student e teste F.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Otimização do método HPLC - MS/MS

Os fragmentos selecionados para a quantificação e identificação são apresentados na Tabela 1. Os fragmentos selecionados estão de acordo com os dados da literatura (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2007; TUC DINH et al., 2011b; FERRER; THURMAN, 2012; MONTEIRO et al., 2018). O íon fragmento mais intenso de cada íon precursor foi selecionado para quantificação. Os parâmetros da fonte de íons ESI para o modo positivo foram definidos da seguinte forma: CUR, 18 psi; CAD, 6 psi; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; tensão do capilar, 5500 V; temperatura da fonte 650°C.

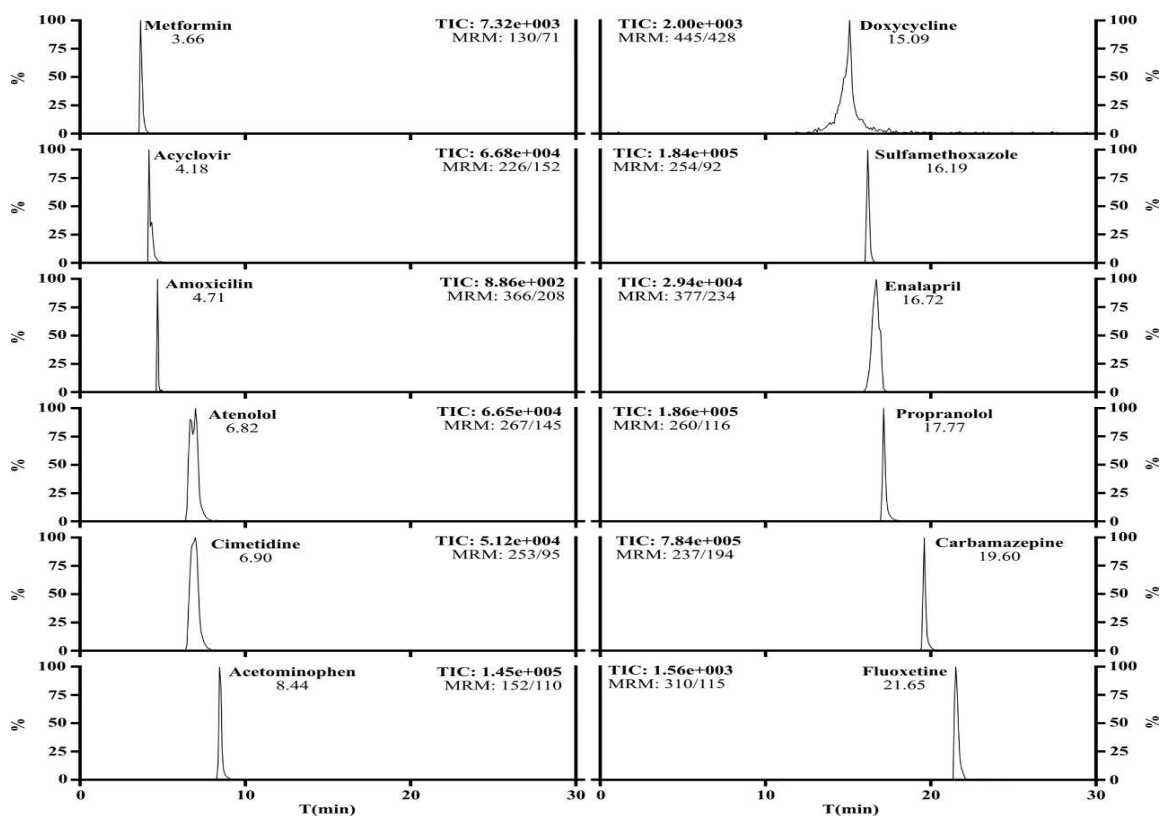
Tabela 1. Transição dos analitos usados para qualificação e parâmetros do MRM.

Fármaco	Íon Molecular [M+H] ⁺	Transição (m/z)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)	CEP (V)	CE (V)
Acetaminofeno	152	110* 65	31,00	9,0	4,00	20,36	21,00
Aciclovir	226	152* 135	16,00	8,50	4,00	22,00	17,00
Amoxicilina	366	208* 114	21,00	4,5	4,00	25,46	23,00
Atenolol	267	145* 57	41,00	10,0	4,00	23,10	33,00
Azitromicina	749	375* 158	56,00	10,0	4,0	34,60	49,00
Cafeína	195	138* 110	36,00	7,50	4,0	21,38	27,00
Captopril	218	70* 75	26,00	4,0	4,00	21,93	31,00
Carbamazepina	237	194* 179	36,00	4,0	9,00	22,38	25,00
Cetoprofeno	255	105* 77	36,00	7,0	4,00	22,81	31,00
Cimetidina	253	95* 61	21,00	7,50	4,00	22,76	35,00
Ciprofloxacino	332	288* 314	31,00	5,0	4,00	24,65	45,00
Diazepam	285	193* 154	46,00	4,50	4,00	23,53	41,00
Doxiciclina	445	428* 154	26,00	8,0	34,00	27,35	23,00
Enalapril	377	234* 91	36,00	5,50	4,0	25,73	25,00
Fluoxetina	310	115* 91	16,00	6,0	4,00	24,13	75,00
Glibenclamida	493	369* 169	31,00	7,50	4,00	28,51	41,00

Glimepirida	491	352* 126	31,00	8,0	4,00	28,44	35,00
Lindocaína	235	86* 58	26,00	7,0	4,00	14,00	21,00
Loratadina	382	337* 267	56,00	8,0	58,00	25,86	33,00
Metformina	130	71* 60	26,00	4,0	4,00	19,83	29,00
Norfloxacina	320	276* 233	31,00	4,50	6,00	24,36	21,00
Propanolol	260	116* 56	31,00	3,50	4,50	22,93	25,00
Sibutramina	280	125* 89	26,00	4,0	4,00	23,42	33,00
Sulfametazaxol	254	92* 65	36,00	4,0	4,00	22,79	63,00
Sulfadiazina	251	156* 92	26,00	9,0	4,00	22,72	19,00

Notas: * Transições usadas para quantificação dos compostos. CE, energia de colisão; CXP, potencial de saída de célula de colisão; CEP, potencial de entrada de células de colisão; DP, potencial de desagrupamento; EP, potencial de entrada.

A otimização dos parâmetros cromatográficos foi realizada de forma a se obter um perfil cromatográfico adequado, buscando a melhor resolução possível entre os picos dos analitos de interesse. A Figura 4 mostra o cromatograma de íons extraído para os 25 produtos farmacêuticos estudados no nível máximo de concentração nas condições otimizadas.



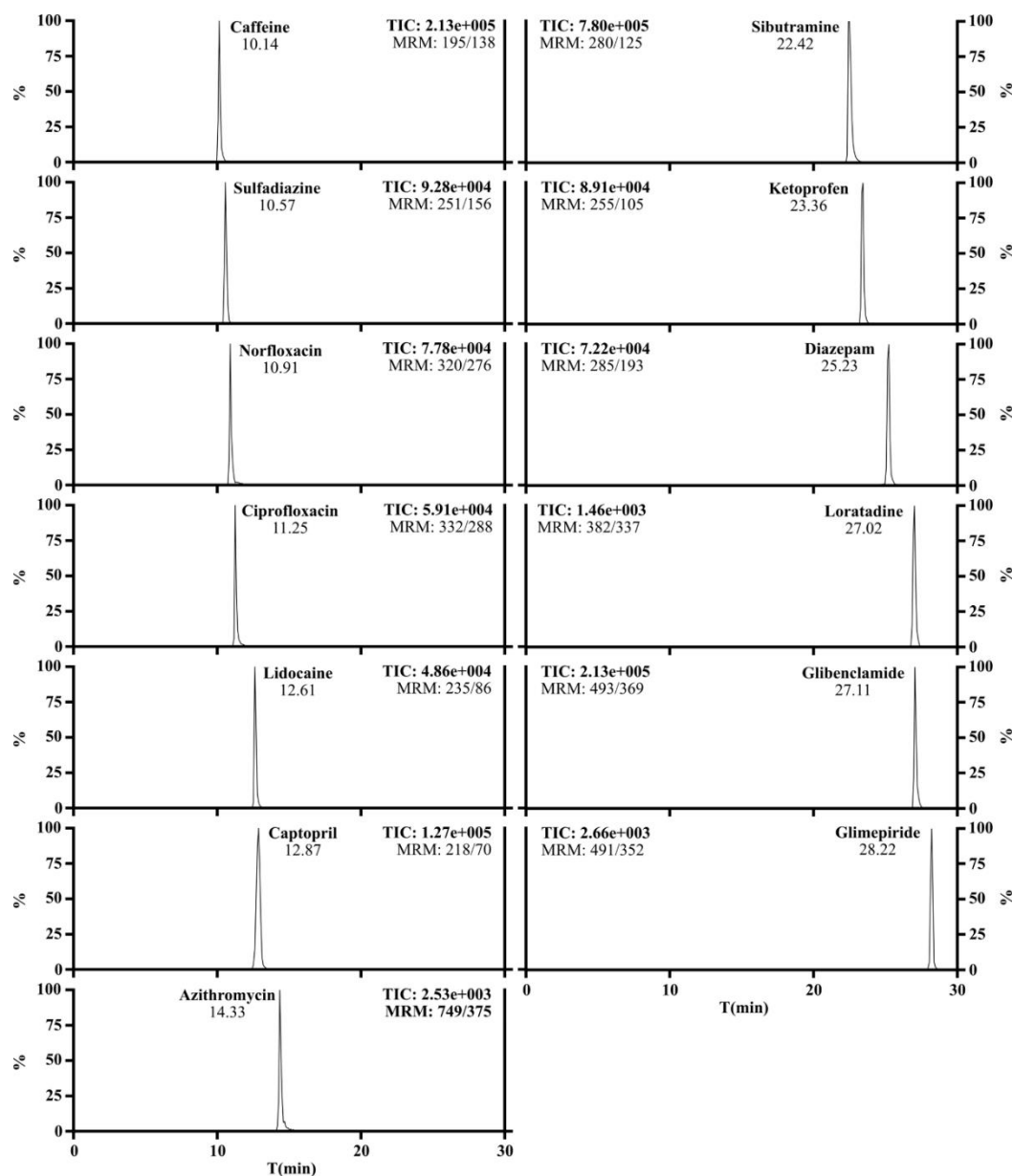


Figura 4. Cromatogramas de íons extraídos correspondentes à análise de produtos farmacêuticos por HPLC - MS/MS. Nota: Coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 com fase móvel água (A) e acetonitrila/água 95: 5 (v/v) (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formato de amônio, com fluxo de $400 \mu\text{L min}^{-1}$. O volume de injeção, 20 μL , temperatura do forno de coluna 30°C .

4.3.2 Validação do método

O presente método mostrou-se seletivo, as comparações da inclinação de ambas as curvas (preparadas em água ultrapura e mistura de matriz) não apresentou diferença estatisticamente significativa (DPR <5%; teste t de Student, $p > 0,05$).

Para amostras ambientais, a recuperação geralmente é determinada a partir da eficiência da extração e variou de acordo com as condições de extração utilizadas (FERRER; THURMAN, 2012). As recuperações de extração (23,77 - 123,49%) obtidas foram reproduzíveis (DPR <7,34) para todos os produtos farmacêuticos avaliados. Aciclovir, amoxicilina, azitomicina, captopril, ciprofloxacina e norfloxacin apresentaram a pior recuperação (<70%) (Tabela 2), mas as recuperações foram reproduzíveis (DPR <8,41%). Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para esses medicamentos (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2007; TUC DINH et al., 2011a; MONTEIRO et al., 2018).

Além disso, a exatidão descreve o rendimento dos analitos obtidos após todas as etapas analíticas, incluindo pré-tratamento e análise instrumental (Tabela 2). De acordo com a Diretiva 2002/657/CE, o intervalo aceitável para os erros relativos a esse intervalo de concentração é de -50 a 20 (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Portanto, o método tem exatidão para todos os compostos.

As precisões intra e inter-dias estavam na faixa de 2,25 - 19,20% e 0,87 - 22,39%, respectivamente (Tabela 2). Além disso, os resultados de precisão inter-dias mostraram igualdade de variâncias (teste F, $p > 0,05$) e as médias não foram estatisticamente diferentes (teste t de Student, $p > 0,05$).

Tabela 2. Valores de precisão, exatidão e recuperação obtidos em cada nível de concentração (continua)

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão						Exatidão	Recuperação (%) em água Miliq	Recuperação (%) no mix da matriz
	Intra-dia DPR%			Inter-dia DPR%			ER	(n=3)	(n=3)
	10	40	60	10	40	60	(n=3)	40	40
Acetaminofeno	12,47	11,20	6,42	19,20	15,78	10,46	13,69	108,97 \pm 5,46	113,89 \pm 6,37
Aciclovir	11,52	3,04	2,63	12,6	7,5	4,7	-8,65	62,68 \pm 0,42	38,99 \pm 5,56
Azitromicina	7,18	11,93	16,42	6,46	7,55	2,90	-20,3	66,61 \pm 8,41	40,32 \pm 2,73
Cafeine	7,45	7,90	10,14	15,43	13,72	11,27	-0,45	96,92 \pm 2,75	87,34 \pm 2,22

Captopril	10,15	9,52	3,52	15,10	10,96	5,11	-34,46	56,84±3,50	43,89±6,21
Carbamazepina	9,20	4,16	0,55	8,06	6,23	4,09	-2,61	96,28±5,21	102,86±2,65
Cimetidina	5,66	7,71	13,12	6,41	6,59	9,59	-13,15	85,58±4,59	70,43±6,54
Ciprofloxacino	7,88	5,33	6,44	7,17	5,55	5,51	-26,72	59,55±2,67	43,87±4,10
Cetoprofeno	7,85	6,31	15,67	16,33	10,60	12,32	-11,42	89,51±4,01	78,69±7,15
Diazepam	5,15	4,92	8,82	8,61	6,31	6,49	19,82	119,88±4,43	123,06±5,89
Enalapril	22,23	0,26	17,18	17,16	6,48	18,96	7,10	109,27±2,55	88,06±1,46
Glimepiride	9,09	18,93	13,70	11,04	3,62	12,28	20,92	117,68±6,92	133,49±4,09
Lindocaina	3,09	4,82	4,14	3,17	1,17	2,35	-11,51	87,37±7,34	70,6±5,77
Loratadina	15,41	10,33	8,51	12,73	8,51	11,61	-14,02	84,46±6,97	31,62±6,23
Metformina	5,33	4,87	2,54	14,98	2,25	8,39	-19,34	80,68±4,34	23,77±7,41
Norfloxacino	9,8	9,42	4,98	4,32	3,65	3,2	-32,6	66,06±3,89	44,29±4,8
Propanolol	9,06	0,49	3,61	9,89	7,49	3,99	-5,24	95,18±2,95	76,56±2,43
Sibutramina	3,75	8,96	7,27	5,19	6,31	8,12	-25,21	72,45±2,16	66,47±6,56
Sulfametazaxol	14,01	11,42	5,65	8,77	4,99	2,65	-4,01	95,67±8,33	84,13±1,99
Sulfatiazine	9,73	9,62	3,15	11,91	14,62	5,67	-16,77	82,77±12,75	64,80±3,88
Precisão				Exatidão			Recuperação (%) em água Miliq	Recuperação (%) no mix da matriz	
	Intra-dia DPR% (n = 6)			Inter-dia DPR% (n = 3)			ER (n=3)	(n=3)	(n=3)
Concentração (µg L⁻¹)	100	350	500	100	500	500	350	350	350
Doxiciclina	17,3	16,26	15,4	15,45	10,40	8,67	8,11	107±3,13	78,54±4,78
Fluoxetina	22,39	10,0	8,60	14,92	16,51	13,86	0,23	100,10±0,65	86,76±3,84
Amoxicillina	15,8	12,45	10,40	10,12	8,9	5,7	-34,6	43,55±1,48	28,66±5,33
Glibenclamida	11,87	8,83	6,19	9,29	4,44	16,77	3,91	101,38±3,27	89,66±6,55
Atenolol	2,14	0,87	2,77	3,17	1,17	2,43	-14,65	72,96±5,08	34,32±1,89

Notas: DPR, desvio padrão relativo; Recuperação mostrada como média ± desvio padrão. ER, Erro relativo

Os resultados de linearidade para faixas avaliadas são mostrados na Tabela 3. A linearidade apresentou coeficientes de correlação maiores que 0,99 para todas as faixas de produtos farmacêuticos estudados, de acordo com a recomendação da ICH (ICH, 2005). Através da análise de regressão, o método mostrou ser linear para todos os compostos de interesse. As concentrações de LoD e LoQ foram definidas entre 10-100 ng L⁻¹ e 20-200 ng L⁻¹, respectivamente. Essas concentrações estabelecidas como limites concordam com os valores encontrados em outros estudos (TUC DINH et al., 2011b; MONTEIRO et al., 2018). Portanto, o presente método foi confiável e preciso para a análise quantitativa de todos os compostos estudados

Tabela 3. Parâmetros da validação do método SPE - HPLC - MS/MS.

Parâmetros	Faixa (ng L ⁻¹)	*Coeficiente angular (n=3)	Slope significance	Coeficiente linear (n=3)	R ²	r	Homocedasticidade ^a	Normalidade Resíduo ^b	do	t _R (min)	LoD (ng L ⁻¹)	LoQ (ng L ⁻¹)
Acetaminofeno	10-60	282,9±8,1	<0,0001	2299,25±18,1	0,9799	0,9898	0,7978	0,2386		8,44	10	20
Aciclovir	10-60	142,3±10,3	<0,0001	-426,2±318,3	0,9879	0,9948	0,9096	0,0934		4,18	10	20
Amoxicilina	100-500	0,68±0,08	<0,0001	203,1±24,20	0,9816	0,9907	0,9214	0,7293		4,71	100	200
Atenolol	100-500	88,90±1,59	<0,0001	5770±432	0,9931	0,9965	0,6520	0,0501		4,82	100	200
Azitromicina	10-60	556±48,54	<0,0001	1765±189,0	0,9926	0,9962	0,5803	0,1154		14,33	14	20
Cafeína	10-60	263,8±21,39	<0,0001	-1118±59,08	0,9923	0,99614	0,7915	0,0656		10,14	10	20
Captopril	10-60	181,1±8,3	<0,0001	-686,4±66,9	0,9851	0,9925	0,784	0,143		12,87	10	20
Carbamazepina	10-60	1706±18,99	<0,0001	6511±773,4	0,9943	0,9971	0,8947	0,1751		19,60	10	20
Cetoprofeno	10-60	951,4±15,99	<0,0001	-1188±56,01	0,9834	0,9916	0,3512	0,0610		23,36	10	20
Cimetidina	10-60	3662±43,56	<0,0001	-924,4±172,3	0,9985	0,9992	0,7461	0,0818		6,90	10	20
Ciprofloxacino	10-60	96,71±3,33	<0,0001	497,6±55,32	0,9957	0,9978	0,7741	0,7107		11,25	10	20
Diazepam	10-60	405±7,9	<0,0001	3901±99,90	0,9675	0,9836	0,6426	0,1884		25,23	10	20
Doxicicline	100-500	103,6±3,16	<0,0001	-1060±64,3	0,9683	0,9840	0,6531	0,1660		15,09	100	200
Enalapril	10-60	1826±6,79	<0,0001	846,6±157,4	0,9875	0,9937	0,6963	0,6655		16,72	10	20
Fluoxetina	100-500	6,09±0,46	<0,0001	-177,8±92,05	0,9750	0,9874	0,4498	0,0816		21,65	100	200
Glibenclamida	100-500	5,108±0,41	<0,0001	76,46±12,8	0,9834	0,9916	0,6477	0,1939		27,11	100	200
Glimepirida	10-60	36,25±2,6	<0,0001	134,2±53,19	0,9740	0,9869	0,3375	0,5178		28,22	10	20
Lindocaina	10-60	7248±14,9	<0,0001	-2644±63,89	0,9921	0,9960	0,6738	0,3623		12,61	10	20
Loratadina	10-60	294,7±5,0	<0,0001	152,2±9,5,19	0,9606	0,9801	0,6738	0,3859		27,02	10	20
Metformina	10-60	1144±22,69	<0,0001	48,87±87	0,9938	0,9968	0,8235	0,1788		3,66	10	20
Norfloxacina	10-60	189±14,95	<0,0001	-93,33±26,9	0,9876	0,9937	0,9368	0,4167		10,91	10	20
Propanolol	10-60	1751±29,92	<0,0001	7576±129,4	0,9858	0,9928	0,7568	0,3225		17,77	10	20
Sibutramina	10-60	1079±4,6	<0,0001	-1753±153,1	0,9956	0,9977	0,7326	0,2533		22,42	10	20
Sulfametazaxol	10-60	236,4±4,18	<0,0001	122,6±17,2	0,9856	0,9927	0,6832	0,7079		16,19	10	20
Sulfadiazina	10-60	456±1,43	<0,0001	-1848±31,9	0,9851	0,9925	0,8117	0,7441		10,57	10	20

Nota: *Coeficientes de regressão mostrados como média \pm desvio padrão; ^aAnderson-Darling ($p > 0,05$); ^b Teste de Brown-Forsythe ($p > 0,05$); t_R , retenção de tempo; R^2 , coeficiente de determinação; r , coeficiente de correlação; LoD, limite de detecção; LoQ, limite de quantificação; LoD e LoQ com fator de concentração.

4.3.3 Avaliação global da ocorrência e concentração dos fármacos

Alguns autores relataram a ocorrência de resíduos de medicamentos em águas superficiais no Brasil, mas ainda não houve um estudo abrangendo várias classes terapêuticas em diferentes rios de uma capital brasileira e comparando a eficiência de eliminação de uma estação de tratamento de água (LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017; MONTEIRO et al., 2018). A Tabela 4 mostra as concentrações mínimas, máximas e a frequência de quantificação dos medicamentos em todos os locais estudados (quatro amostras foram coletadas em dias diferentes no rio Belém e no rio Barigui e uma amostra no rio Atuba, Iguaçu e na Estação Tratamento de Água Industrial). Como pode ser observado na Tabela 4, muitas das substâncias estudadas foram quantificadas frequentemente nos diferentes rios.

Dos antibióticos estudados, o sulfametoxazol foi encontrado com maior frequência ($n=14$) e concentração ($1,85 \mu\text{g L}^{-1}$ no rio Barigui). Em seguida a amoxicilina e a azitromicina foram os antibióticos mais presentes ($n=12$) com as maiores concentrações ($6,35 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,65 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente), ambos no rio Barigui. A ciprofloxacina ($0,34 \mu\text{g L}^{-1}$), norfloxacina ($0,13 \mu\text{g L}^{-1}$) sulfatiazina ($0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) e doxicilina ($< 0,2$) foram os antibióticos menos detectados nas amostras.

Isso pode ser explicado pelo fato de as tetraciclina (doxicilina) e fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina) serem mais facilmente absorvidas nos sedimentos que macrólidos (azitromicina), sulfonamidas e β -lactamas (amoxicilina) (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007). Além da forte adsorção nos sedimentos, a não detecção da doxicilina nas amostras de água pode ser devido a mecanismos como complexação com metais (MONTEIRO et al., 2018).

Estudos conduzidos por Locatelli et al. (2010) em rios localizados em São Paulo-Brasil, mostraram a presença de amoxicilina ($2,42 \mu\text{g L}^{-1}$), ciprofloxacina ($0,11 \mu\text{g L}^{-1}$), norfloxacina ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$) e o sulfametazaxol ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$). Em uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro - Brasil, verificou-se a presença de azitromicina, amoxicilina e

sulfametaxazol, com concentrações de até 35 ng L⁻¹; 287,5 ng L⁻¹; 287,5 ng L⁻¹ respectivamente (MONTEIRO et al., 2018).

Assim como sulfametaxazol, a carbamazepina também foi frequentemente (n=13) encontrada nas amostras desde estudo em níveis de até 1,59 µg L⁻¹. A carbamazepina e o sulfametaxazol são compostos muito descritos na literatura pelo seu consumo, ocorrência, persistência no ambiente e resistência ao tratamento (DE VOOGT et al., 2009; HAN; LEE, 2017; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017). Além disso, assim como o propranolol, esses fármacos são resistentes à fotodegradação, favorecendo sua permanência no ambiente (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007).

Outras drogas psiquiátricas também foram encontradas, como diazepam (n=14) e a fluoxetina (n=10). O primeiro teve maior concentração no primeiro ponto de amostragem do rio Belém (0,23 µg L⁻¹), enquanto o segundo no rio Barigui (0,62 µg L⁻¹). Em estudos nos continentes africanos e europeus o diazepam e a fluoxetina são geralmente detectados em níveis de concentração abaixo de 100 ng L⁻¹ e 109,2 ng L⁻¹, respectivamente, em ambientes aquáticos (FEKADU et al., 2019).

Analgésicos e antiinflamatórios são a classe de substâncias farmacêuticas mais frequentemente detectados no meio ambiente (EBELE; ABOU-ELWAFAB ABDALLAH; HARRAD, 2017; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017; FEKADU et al., 2019). No presente trabalho, o acetaminofeno (n=16) e cetoprofeno (n=10) estavam presentes na maioria das amostras analisadas com concentrações variando de 0,03 - 1,69 e 0,02 - 1,10 µg L⁻¹.

Os anti-hipertensivos como enalapril e o atenolol foram quantificados em todos os rios, sendo que a maior concentração foi encontrada no rio Barigui (0,12 µg L⁻¹ e 5,3 µg L⁻¹, respectivamente). Já o propranolol foi encontrado em concentrações de até 0,03 µg L⁻¹ (n=8). O captopril foi encontrado em maior concentração no rio Barigui (2,61 µg L⁻¹), enquanto no rio Atuba não foi detectado em nenhuma das coletas.

Quanto aos antidiabéticos, a metformina foi a que apresentou maior frequência (n=15) e a glibenclamida a maior concentração no primeiro ponto do rio Belém (1,26 µg L⁻¹). A metformina é um medicamento comumente encontrado em águas superficiais na Europa. Em um estudo feito no rio Elbe na Alemanha a concentração de metformina encontrada foi de 1,7 µg L⁻¹ (SCHEURER et al., 2012), ou seja, concentração superior a encontrada no presente estudo (<0,83 µg L⁻¹).

Tabela 4. Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos resíduos farmacêuticos investigados nas amostras de água dos rios Belém, Barigui, Atuba, Iguaçu e na ETAI (continua)

Rio Belém (n=4)									Rio Barigui (n=4)				Rio Atuba (n=2)				Iguaçu (n=1)					
3,8 km da nascente					9,2 km da nascente																Rio	ETAI
Farmaco	Min	Max	Média	Total amostras positivas ^a	Min	Max	Média	Total amostras positivas ^a	Min	Max	Média	Total amostras positivas ^a	Min	Max	Média	Total amostras positivas ^a	Raw water	Effluent	Removal (%)			
Acetaminofeno	0,02	0,4	0,3	4	0,03	0,4	0,27	4	0,65	1,69	1,35	4	0,1	0,8	0,4	2	0,05	0,08	-60			
Aciclovir	0,02	1,46	0,98	2	0,02	1,45	0,99	2	0,06	1,5	0,87	3	0,1	nd	0,1	1	< 0,020	< 0,020	-			
Amoxicillina	0,2	1,57	1,06	2	0,23	0,4	0,3	3	2,64	6,35	4,67	3	< 0,20	<0,20	-	2	< 0,20	< 0,20	-			
Atenolol	<0,2	1,82	1,82	2	0,27	1,81	1,04	2	0,63	5,3	1,58	4	0,3	0,54	0,42	2	< 0,020	< 0,020	-			
Azitromicina	0,04	0,5	0,06	3	0,03	0,2	0,11	3	0,07	0,65	0,36	2	<0,020	nd	-	1	0,06	< 0,020	100			
Cafeína	1,52	9,78	5,65	4	0,2	5,86	0,9	4	4,87	14,82	9,84	4	1,3	5,3	3,3	2	7,24	4,35	40			
Captopril	0,09	0,09	0,09	2	<0,020	0,19	0,19	2	1,32	2,61	1,92	3	<0,020	nd	-	1	0,13	nd	100			
Carbamazepina	<0,02	0,28	0,18	3	<0,020	0,38	0,23	3	0,22	1,59	0,84	3	0,3	1,3	0,8	2	0,22	0,20	9			
Cetoprofeno	0,06	2,15	1,10	2	0,05	0,06	0,05	2	0,28	0,36	0,32	3	<0,020	nd	-	1	0,09	0,17	-88			
Cimetidina	nd	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	0,079	nd	0,07	1	nd	nd	nd	0	nd	nd	-			
Ciprofloxacino	nd	< 0,02	-	2	0,13	0,34	0,2	3	<0,020	0,3	0,18	2	0,02	nd	0,02	1	nd	nd	-			
Diazepam	<0,020	0,117	0,19	4	0,05	0,23	0,11	4	<0,020	0,03	0,03	3	0,21	0,34	0,10	2	0,056	0,09	-60			
Doxiciclina	nd	< 0,20	nd	2	nd	< 0,20	-	2	nd	nd	-	0	nd	nd	nd	0	nd	nd	-			
Enalapril	0,02	0,04	0,03	2	0,04	0,027	0,03	2	0,12	0,06	0,07	3	0,2	0,45	0,35	2	0,09	0,06	33			
Fluoxetina	nd	< 0,20	-	2	< 0,20	0,15	0,15	2	0,51	0,62	0,57	2	<0,020	0,08	0,08	2	< 0,20	nd	-			
Glibenclamida	0,8	1,26	1,07	3	0,71	nd	0,65	2	0,32	1,65	0,98	2	nd	0,3	0,3	1	0,97	nd	100			
Glimepirida	0,2	0,12	0,16	2	0,04	0,08	0,06	2	0,03	0,11	0,06	3	<0,020	0,12	0,12	2	0,038	nd	100			
Lindocaína	<0,020	0,04	0,03	4	0,08	0,03	0,05	4	0,02	0,35	0,02	4	0,54	0,56	0,55	2	0,06	0,05	10			
Loratadina	nd	<0,020	-	1	<0,020	nd	-	1	nd	nd	-	0	nd	nd	-	0	nd	nd	-			
Metformina	0,26	0,28	0,25	4	0,33	0,06	0,08	4	0,22	0,83	0,61	3	0,34	0,83	0,59	2	0,28	0,21	25			
Norfloxacino	nd	0,11	0,11	1	nd	nd	-	0	0,13	0,02	0,07	2	<0,020	nd	-	1	nd	nd	-			

Propanolol	<0,020	0,03	0,03	2	nd	<0,020	-	2	nd	<0,020	-	1	<0,020	nd	-	2	<0,020	nd	100
Sibutramina	nd	<0,020	-	1	<0,020	0,04	0,04	2	nd	nd	-	0	nd	nd	-	0	nd	nd	-
Sulfametazaxol	0,15	0,33	0,13	4	0,02	0,36	0,17	3	0,15	1,86	0,2	4	0,88	1,23	1,05	2	0,19	nd	100
Sulfatiazina	nd	nd	-	0	<0,020	0,1	0,1	2	<0,020	nd	-	2	nd	nd	-	0	0,03	nd	100

Nota: ^a Considerando apenas resultados positivos, número de amostras com concentrações acima do LoD.

O antirretroviral aciclovir teve a concentração máxima de $0,99 \mu\text{g L}^{-1}$. Se compararmos com resultados encontrados na Alemanha, a concentração encontrada em águas superficiais foi inferior à deste estudo, apresentando $0,19 \mu\text{g L}^{-1}$ de aciclovir em água superficial e $1,78 \mu\text{g L}^{-1}$ em esgoto (PRASSE et al., 2010). Ainda há poucos estudos relatando a presença de antirretrovirais na literatura, apesar de ser uma classe de medicamentos perigosos em relação à toxicidade (PRASSE et al., 2010; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2017).

A lidocaína e cafeína foram os compostos quantificados em todas as amostras. É interessante notar que a cafeína apresentou os valores mais altos de concentração e frequência em todos os rios estudados corroborando com seu papel de traçador de poluição antrópica (IDE et al., 2017). Sendo assim, os resultados mostram concentrações diferentes de cafeína nos rios, indicando níveis de poluição diferente. Apesar de altos valores encontrados para esta substância, ela apresenta baixo risco para a vida aquática e humana (SODRÉ; DUTRA; DOS SANTOS, 2018). Dados semelhantes foram obtidos por (SODRÉ et al., 2007), o qual encontrou cafeína em todas as amostras coletadas no rio Atibaia (São Paulo- Brasil).

Em geral, as concentrações dos medicamentos estudados nos rios de Curitiba - Brasil foram mais altas do que as encontradas na literatura internacional para águas superficiais (KASPRZYK-HORDERN; DINSDALE; GUWY, 2007; KIM et al., 2007; FERRER; THURMAN, 2012; LIN; YU; CHEN, 2016; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017; MADIKIZELA; TAVENGWA; CHIMUKA, 2017; SODRÉ; DUTRA; DOS SANTOS, 2018; ZHANG et al., 2018). Ainda, as concentrações também variam de acordo com classe terapêutica, como por exemplo, maiores concentrações de analgésicos em relação a antibióticos (WILLE et al., 2010; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). Isso leva-nos a pensar sobre a qualidade das águas dos rios da cidade e a quantidade de efluente doméstico que entra irregularmente nesses rios.

Durante o tempo de estudo também é possível observar grandes variações nas concentrações de resíduos de medicamentos, mostrando um aporte contínuo de poluição. Visto que geralmente as substâncias farmacêuticas são pouco voláteis, a distribuição no ambiente ocorrerá principalmente por transporte aquoso (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007). Embora nem todo medicamento tenha alta persistência, eles são onipresentes no ambiente porque as taxas de entrada são superiores às suas taxas de autodepuração da água (NIKOLAOU; MERIC; FATTA, 2007; KÜMMERER, 2008).

4.3.4 Avaliação da dispersão dos fármacos no rio Belém

Na Tabela 4 é possível ver o resultado das amostras coletadas em dois pontos do rio Belém (3,8 km e 9,2 km) mostrando que algumas concentrações de fármacos diminuem ao longo do rio (acetaminofeno, amoxicilina, atenolol, cafeína, cetoprofeno, diazepam, glibenclamida, glimeperide, metformina, norfloxacin e propranolol). O ponto de coleta mais próximo da nascente é localizado próximo a um parque da cidade onde frequentemente há pessoas praticando pescaria. O ponto de coleta mais distante da nascente é localizado no centro da cidade.

Apesar da maior concentração de atividade humana estar no centro, a coleta neste ponto apresentou para maioria das substâncias concentrações mais baixas dos que encontrado no primeiro ponto de coleta. Isso pode indicar maior presença de habitações e ligações irregulares de esgoto no primeiro ponto, sendo este fato comprovado pela determinação de cafeína (5,65 no ponto 1 e 0,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ no ponto 2) (IDE et al., 2017). Logo, de modo indireto, à primeira vista, isso pode mostrar que há melhores condições de saneamento na região central da cidade.

Entretanto, outra discussão possível para essa menor concentração de resíduos no rio Belém no centro da cidade, pode ser relacionado as diferentes vazões de água nos dois pontos de coleta. O rio Belém no centro tem uma vazão oito vezes maior que no ponto de coleta próximo ao parque São Lourenço, isso diluiria os resíduos farmacêuticos presentes nessa região.

Outros resíduos farmacêuticos tiveram suas concentrações relativamente constante ao longo do rio como é o caso da enalapril, fluoxetina, carbamazepina e sulfametazaxol.

O aciclovir, azitromicina, captopril, ciprofloxacino, lindocaína, sibutramina e sulfatiazida aumentaram a concentração ao longo do rio Belém. As propriedades físicas dos micropoluentes podem afetar o movimento de contaminantes de um estágio para outro (por exemplo, movimento solo - água). A mobilidade dos compostos é determinada por fatores de transporte/retenção que dependem de propriedades químicas relacionadas, como constante de dissociação ácida (pKa) e coeficiente de partição octanol-água (Kow) (KIM; ZOH, 2016; MADIKIZELA; TAVENGWA; CHIMUKA, 2017).

4.3.5 Avaliação da remoção dos fármacos em uma ETAI

Na Tabela 4 ainda é possível observar a presença de muitos medicamentos nas águas superficiais do rio Iguaçu e a eficiência de remoção após a passagem da água na Estação de Tratamento de Água Industrial (ETAI). Apesar do efluente desta ETAI servir somente indústrias da região, operações unitárias (coagulação/sedimentação, filtração de areia e cloração) empregadas nas estações são similares ao da água que serve a população.

Visto que os sistemas de tratamento de água existentes não podem remover completamente os medicamentos da água, o conhecimento de remoção dos medicamentos por ETA contribui para a melhora da produção de água potável. Azitromicina, captopril, glibenclamida, glimeperide, propranolol, sulfametazaxole, sulfatiazine apresentaram alta eficiência de remoção (~100%) após o processo de tratamento da água. No entanto, a eficiência de remoção foi baixa para compostos como cafeína (40%), carbamazepina (9%), enalapril (33%) e metformina (25%).

As taxas de remoção de medicamentos podem ser diferentes nos estudos publicados na literatura devido ao uso de diferentes métodos de medição e configurações do processo de tratamento (KIM; ZOH, 2016). Nam et al (2014) relata que a eficiência de remoção de micropoluentes detectados em uma ETA variou de 6% a 100%. Acetaminofeno, cafeína e carbamazepina foram removidos (>80%) da estação. Já no processo estudado por Jiang (2019), as seguintes taxas de remoção foram encontradas: cetoprofeno (62,84%), carbamazepina (4,14%), cafeína (8,49%), sulfadiazine (68,53%), sulfamethoxazole (44,37%), acetaminofeno (89,19%).

Contudo, no presente estudo a concentração de acetaminofeno, cetoprofeno e diazepam aumentaram, resultando em remoção negativa. Taxas de remoção negativas foram observadas por outras pesquisas anteriores (LIN; YU; CHEN, 2016; ZHANG et al.,

2018). Essas taxas podem ocorrer devido a liberação de produtos farmacêuticos adsorvidos em partículas orgânicas, a metabólitos conjugados que podem se transformar em seus precursores por processos enzimáticos, e a propriedades físico-químicas dos contaminantes ou os processos de tratamento aplicados (JIANG et al., 2019).

4.4. CONCLUSÃO

Neste capítulo a combinação de SPE e HPLC - MS/MS permitiu a detecção e quantificação multiclases de 25 resíduos farmacêuticos com diferentes estruturas químicas em água da superfície (rios) e em uma ETAI a nível de traços. O método foi validado de acordo com os critérios de garantia da qualidade do laboratório, de acordo com a Decisão 2002/657/CE da Comissão e ICH (2005). Sendo assim, este método pode ser usado por outros pesquisadores para investigação desses micropoluentes em matrizes aquosas. A pesquisa indicou presença dos resíduos farmacêuticos pesquisados nas águas superficiais dos rios Belém, Barigui, Atuba e Iguaçu evidenciando a existência de águas residuárias domésticas. Sendo assim, diversos outros micropoluentes de origem farmacêutica podem estar presentes nesses corpos aquáticos.

Portanto, torna-se importante a realização de mais estudos como esse, com a finalidade de investigar a presença de outros micropoluentes, visto que a Bacia do Alto Iguaçu tem relevância econômica para região. Embora os rios Belém, Barigui e Atuba não sejam utilizados para captação de água para abastecimento devido à poluição, há uma preocupação em melhorar a qualidade desses rios por estarem inseridos na paisagem urbana, recreações humanas e essa poluição ser tóxicos para outros organismos vivos.

Como a entrada dos medicamentos no meio ambiente e a contaminação de águas superficiais são contínuas, os processos convencionais de tratamento de água devem reduzir os vestígios desses micropoluentes. Foi possível observar essa redução para azitromicina, captopril, glibenclamida, glimeperide, propranolol, sulfametazaxol, sulfatiazina. No entanto, o processo não foi eficaz na remoção de substâncias como cafeína, carbamazepina, enalapril e metformina. Por isso, é essencial uma compreensão abrangente da ocorrência e destino dos resíduos de medicamentos na água de superfície e na água potável para poder prever efetivamente os efeitos dos micropoluentes de origem farmacêutica no ambiente receptor.

5. CAPÍTULO II

OCORRÊNCIA DE ANTIBIÓTICOS E AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES NOS RIOS BELÉM E BARIGUI DA CIDADE DE CURITIBA -BR

Publicado em: Beatriz Böger, Monica Surek, Raquel de O Vilhena et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. Journal of Hazardous Materials, v. 402, n. 123448, 2021.

5.1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são amplamente utilizados para terapias humanas e veterinárias, porém seu consumo tem aumentado significativamente nas últimas décadas (DANNER et al., 2019). De acordo com um estudo recente da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil tem a maior taxa de uso de antibióticos nas Américas, com aproximadamente 22,8 doses diárias definidas por 1.000 habitantes, sendo a amoxicilina e a azitromicina as mais utilizadas (WHO, 2018). Apesar de seus benefícios, os antibióticos foram recentemente reconhecidos como poluentes ambientais aquáticos, com potenciais efeitos adversos para o ecossistema e a saúde humana (MANAIA, 2017; BÖGER et al., 2020).

Existe um interesse público crescente em avaliar a resistência a antibióticos em áreas ambientais, devido à presença de concentrações residuais desses compostos bioativos em solos e águas naturais, pois grandes quantidades dessa classe farmacêutica e seus metabólitos são liberados no ambiente aquático (ABRAHAM et al., 2007; MANAGAKI et al., 2007; LUO et al., 2010; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011; COUTINHO et al., 2014; KIM et al., 2018).

Esta liberação contribui para a seleção de bactérias resistentes, sugerindo que a persistência e disseminação está intimamente relacionada à poluição por antibióticos (HU; ZHOU; LUO, 2010; PRUDEN; ARABI; STORTEBOOM, 2012). Assim, o monitoramento dessa classe farmacêutica em águas superficiais é fundamental para descobrir se baixas concentrações contribuem para a manutenção e a propagação de bactérias resistentes aos antibióticos (SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; PRUDEN; ARABI; STORTEBOOM, 2012; BERGERON et al., 2015).

A presença de bactérias resistentes aos antibióticos em sistemas fluviais urbanos é crítica para a qualidade da água e a saúde pública, pois a água de superfície é usada para fins agrícolas e atividades recreativas, como natação e pesca (IWANE; URASE; YAMAMOTO, 2001; HAM et al., 2012; COUTINHO et al., 2014; KIM et al., 2018; ORTEGA-PAREDES et al., 2019). Os rios urbanos usados com frequência pela população podem ter microrganismos resistentes de origem fecal associados ao descarte irregular de efluentes nessas áreas (IWANE; URASE; YAMAMOTO, 2001; ABRAHAM et al., 2007; ORTEGA-PAREDES et al., 2019).

Muitos estudos sobre a presença de antibióticos em águas residuais e de superfície foram realizados em países da América do Norte, Europa e Ásia (IWANE et al., 2007; MANAGAKI et al., 2007; TAMTAM et al., 2008; HU; ZHOU; LUO, 2010; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; BERGERON et al., 2015). No entanto, em países em desenvolvimento como o Brasil, onde alguns setores da população não têm acesso adequado ao saneamento, esses estudos são escassos.

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, aproximadamente 82% dos municípios brasileiros despejam a maior parte de suas águas residuais nos rios (IBGE, 2000). Quando as estações de tratamento de esgoto são limitadas, são esperadas concentrações ambientais mais elevadas de antibióticos e os riscos potenciais são aumentados (ABRAHAM et al., 2007; SODRÉ; LOCATELLI; JARDIM, 2010; LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011; COUTINHO et al., 2014).

Curitiba é uma das cidades mais desenvolvidas do Brasil, com uma população de mais de três milhões com a região metropolitana. Com a recente, rápida urbanização e o aumento da população os rios urbanos sofreram muito com a poluição (BOLLMANN; EDWIGES, 2008; LOPARDO; FERNANDES; AZEVEDO, 2008).

Assim, considerando a escassez de estudos na literatura nacional (DROPA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2017) e problemas de saúde causados pelo aumento de bactérias resistentes a antibióticos em ambientes aquáticos (MANAIA, 2017), o objetivo deste capítulo foi avaliar a ocorrência e distribuição de antibióticos e bactérias resistentes associadas em dois rios da cidade de Curitiba. Podendo assim, fornecer evidências sobre a contribuição de águas residuais para os níveis de antibióticos nos rios da cidade, podendo os resultados refletir em melhores políticas públicas de prescrição de antibióticos e de saneamento para a população nessas áreas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes e Insumos

Acetonitrila e metanol de alto desempenho para cromatografia líquida de alta eficiência foram obtidos da Merck (Darmstadt, Hessen, Alemanha). O ácido fórmico (98%) e o formato de amônio (99%) foram adquiridos na Sigma – Aldrich (St. Louis, Missouri,

EUA). A água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação de água Merck Millipore Milli-Q (Bedford, Massachusetts, EUA). Os padrões químicos de norfloxacin (99,8%) e ciprofloxacina (93,4%) foram adquiridos da Zhejiang Langhua Pharmaceutical Co. (Linhai, Zhejiang, China). Doxiciclina (98,7%), amoxicilina (98%) e sulfametoxazol (99,5%) foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Baviera, Alemanha). A azitromicina (94,4%) foi adquirida da Alembic Pharmaceuticals Limited (Panelav, Gujarat, Índia). As soluções estoques desses antibióticos de estoque foram preparadas de acordo com a solubilidade em metanol e/ou água (1 mg mL^{-1}) e armazenadas a -40°C , no escuro por um período máximo de um mês. As soluções de trabalho foram preparadas a fresco em água e acetonitrila (50:50 v/v), contendo ácido fórmico a 0,1% e formiato de amônio $5 \text{ }\mu\text{M}$ de forma a se obter concentrações finais de 100, 10 e $1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.2.3 Área de estudo

Três amostras de água foram coletadas nos rios Belém e Barigui em Curitiba – BR (Figura 5). No total seis amostras foram coletadas em garrafas de vidro âmbar estéreis em três semanas diferentes de novembro de 2019. A amostragem foi realizada em pontos com corrente de água, em locais previamente selecionados:

- Ponto 1- Rio Belém a 9,2 km da nascente do rio ($25^{\circ} 25' 13,1'' \text{ S}$; $49^{\circ} 16' 09,5'' \text{ W}$), amostra de água coletada na ponte da Avenida Cândido de Abreu;
- Ponto 2- Rio Barigui ($25^{\circ} 25' 54,7'' \text{ S}$ $49^{\circ} 18' 49,9'' \text{ W}$), amostra de água coletada na saída do lago do parque Barigui.

De cada uma das seis amostras foram removidos 20 mL para testes microbiológicos e o restante foi filtrado a vácuo através de uma fibra de vidro com tamanho de poro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, filtro de 47 mm de diâmetro (Millipore).

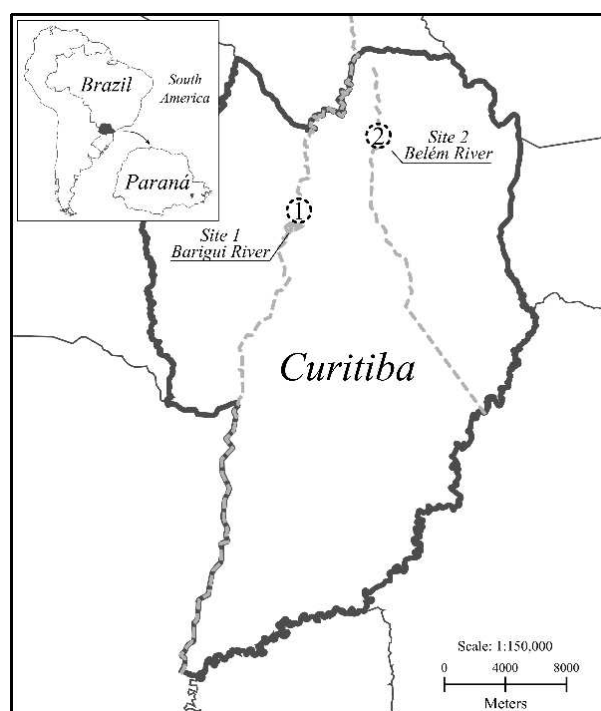


Figura 5. Locais selecionados para coleta das amostras nos rios Belém (1) e Barigui (2) em Curitiba - Brasil. Fonte: Autora, 2020.

O pH (tiras Macherey-Nagel), temperatura da água ($^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido (%) (OD, mg L^{-1}) e saturação de OD (%) das amostras foram medidas no local, utilizando uma sonda incorporada modelo Yellow Springs 550A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As análises de demanda química de oxigênio (DQO) foram realizadas de acordo com os Métodos Padrão (APHA, 1995) e a demanda biológica de oxigênio (DBO) foi realizada de acordo com o Método 5210B da Norma Regulamentadora Brasileira 12614 (ABNT, 1992).

5.2.4 Preparo de amostra

A SPE foi realizada em um manifold de extração Waters (Milford, Massachusetts, EUA), com cartuchos Phenomenex Strata-X® 200 mg, 3 mL^{-1} (Torrance, Califórnia, EUA). Os cartuchos SPE foram condicionados com 4 mL de metanol e seguida por 6 mL de água ultrapura. 250 mL de amostra de água foram pré-concentrados através do cartucho em fluxo constante de 10 mL min^{-1} . Posteriormente, os cartuchos foram secos com nitrogênio por 2 minutos e os analitos foram eluídos em 4 mL de metanol. Os extratos foram evaporados até

à secura em um banho termostático a 30° C sob fluxo suave de nitrogênio. Os resíduos foram dissolvidos em 0,5 mL de fase móvel (água e acetonitrila a 50:50 v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 µM de formato de amônio. As amostras foram transferidas para vials e injetadas no HPLC - MS/MS.

5.2.5 Técnicas de análise e condições analíticas

A HPLC - MS/MS foi composto por um sistema Agilent 1200 HPLC (Santa Clara, Califórnia, EUA), consistindo em uma bomba binária G1312B com desgaseificador G1379B e forno de coluna G1316B, conectado a um gerenciador de amostras CTC Sample Manager Waters (Milford, Massachusetts, EUA) Modelo 2777, operado a 5 ° C. O sistema HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo Applied Biosystems/MDS Sciex API 3200 (Vaughan, Ontário, Canadá) equipado com uma bomba de seringa Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, EUA) e uma fonte de íons ESI operada em modo positivo. A quantificação foi realizada no modo de monitoramento MRM. As transições dos íons e os parâmetros individuais do composto, incluindo o DP, EP, CEP, CE, CXP são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Condições operacionais de espectrometria de massa para análises de antibióticos.

	Íon molecular [M+H] ⁺	Fragmentos (m/z)	CE (EV)	CXP (V)	DP (V)	EP (V)	CEP (V)
Amoxicilina	366	208* 114	23	4.0	21	4,5	25,46
Azitromicina	749	375* 158	49	4	56	10	34,60
Ciprofloxacina	332	288* 314	45	4	31	5	24,65
Doxiciclina	445	428* 154	23	34	26	8	27,35
Norfloxacina	320	276* 233	21	6	31	4,5	24,36
Sulfametoxazol	254	92* 65	19	4	26	9	22,79

Nota: * Transição usada para quantificação no modo MRM. CE; energia de colisão, CXP; potencial de saída celular, DP; potencial de desagrupamento, EP; potencial de entrada, CEP; potencial de entrada de células de colisão.

Os parâmetros da fonte de íons para o modo ESI positivo foram: CUR, 18 psi; CAD, 6 psi; tensão o capilar, 5500 V; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi e temperatura da fonte, 650 ° C. Nitrogênio de alta pureza foi usado para CUR, GS1, GS2 e CAD, sendo produzido por meio de um gerador de nitrogênio de alta pureza da Peak Scientific (Inchinnan, Escócia, Reino Unido).

A separação do analito foi realizada em uma coluna Agilent Zorbax® Eclipse XDB-C8 (4,6 mm×150 mm, 5 µm), mantida a 30 ° C. A fase móvel consistiu em água (A) e acetonitrila/água 95: 5 (v/v) (B), ambos contendo ácido fórmico a 0,1% e formiato de amônio 5 µM. Uma eluição em gradiente começou com 10% de B e aumentou linearmente de 10% de B para 100% de B, em uma rampa de 0 a 35 minutos. A vazão foi de 400 µL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL. A agulha foi lavada com metanol/água (50:50, v/v) entre as injeções. A aquisição de dados foi realizada em uma estação de trabalho MS usando o software Analyst® SCIEX versão 1.4.2.

5.2.6 Validação analítica

O método foi validado de acordo com as diretrizes da Decisão 2002/657/CE da Comunidade Européia (CE, 2002) e Harmonização de Conferências Internacionais (ICH, 2005). Os parâmetros de validação incluíram seletividade, LoD, LoQ, linearidade, recuperação, exatidão e precisão. As amostras de águas superficiais foram preparadas de acordo com o tópico de preparação de amostras. As amostras foram adicionadas com soluções padrão de antibióticos para fins de validação.

A seletividade foi avaliada comparando-se as inclinações de duas curvas analíticas. LoD e LoQ foram estimados a partir da injeção de diluições sucessivas de amostras, fortificadas em baixos níveis de concentração. Esses parâmetros foram estabelecidos com base em uma relação sinal/ruído de 3:10. A linearidade foi avaliada usando sete níveis diferentes de concentração de antibióticos, na faixa de 10 a 60 µg L⁻¹ para azitromicina, norfloxacin, ciprofloxacina, sulfametoxazol e 100-500 µg L⁻¹ para amoxicilina e doxiciclina. A recuperação foi determinada em águas superficiais com LoQ mínimo e níveis máximos de curva de calibração. A exatidão e a precisão do método foram avaliadas em extratos de águas superficiais em três concentrações diferentes; 10, 40 e 60 µg L⁻¹ para

azitromicina, norfloxacin, ciprofloxacina, sulfametoxazol e 100, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para amoxicilina e doxiciclina.

5.2.7 Teste de resistência ao antibiótico

Foram inoculados em meios seletivos a azitromicina, amoxicilina, norfloxacin, ciprofloxacina, doxiciclina, sulfametoxazol e ceftriaxona, para investigar a resistência a bacteriana. Todos os reagentes foram autoclavados (103 kPa, 121 ° C, 15 min) e filtrados (filtro de seringa PALL Acrodisc, membrana Suppor de 0,2 μm). As soluções antibióticas foram preparadas de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2019) em garrafas de vidro âmbar autoclavadas (103 kPa, 121 ° C, 15 min), nos pontos de concentração de corte (concentração inibitória mínima - CIM) indicados para cada antibiótico.

Os meios de cultura selecionados para este estudo, nos quais foram aplicados antibióticos, foram: ágar Baird-Parker, seletivo para *Staphylococcus aureus* (Difco, Sparks, EUA) suplementado com cloreto de trifenitretrazólio a 1% (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra); Kenner Fecal Agar (KF), seletivo para *Enterococcus sp* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) suplementado com enriquecimento de gema de ovo com telurito (Laborclin, Pinhais, Brasil); ágar Cetrimide, seletivo para *Pseudomonas aeruginosa* (Difco, Sparks, EUA); e ágar Rapid '2 Coli , seletivo para *Escherichia coli* (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, França).

As estirpes de *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (American Type Culture Collection, Rockville, MD) foram utilizadas como controles negativos. A suscetibilidade ou resistência foram determinadas usando pontos de interrupção estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2019). As concentrações finais de antibióticos são mostradas na Tabela 6 para cada meio de cultura.

Tabela 6. Concentração de antibióticos inoculados em meios seletivos de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Bactéria estudada	Concentração dos antibioticos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	Ágar Rapid' 2 Coli <i>E. coli</i>	Ágar Kenner Fecal <i>Enterococcus sp.</i>	Ágar Cetrimide <i>P. aeruginosa</i>	Ágar Baird-Parker <i>S. aureus</i>
Azitromicina	-	-	-	8
Amoxicillina ^a	32	16	-	0,5

Ciprofloxacina ^a	4	4	4	4
Doxiciclina ^a	16	16	-	16
Norfloxacina ^b	16	16	16	16
Sulfamethoxazol ^a	512	-	-	512
Ceftriaxone ^a	4	-	-	-

Nota: ^aCLSI 2019, ^bCLSI 2018.

Alíquotas de amostra de 800 µL foram adicionadas assepticamente e espalhadas em placas estéreis (placas com a presença de antibióticos) usando alças de Drigalski. Todo o revestimento foi realizado em triplicada. Após a adição da amostra, as placas foram secas em uma cabine de segurança biológica e incubadas a 37° C por 24 h, exceto as placas Rapid '2 Coli que foram incubadas a 44° C por 24 h. Após a incubação, as colônias foram contadas. Além disso, testes de resistência complementares foram realizados para investigar *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina, em placas de vancomicina (Newprov, Pinhais, Brasil) e *E. coli* produtora de β-lactamases de amplo espectro no ágar Rapid '2 Coli, mais ceftriaxona (1 µg mL⁻¹). *Enterococcus spp.* os resistentes à vancomicina também foram testados quanto à resistência à gentamicina de alto nível (120 µg) e estreptomicina (300 µg).

Para identificar as espécies, foram realizados testes fenotípicos (bile esculina, tolerância ao sal, catalase, motilidade, produção de pigmentos, arginina di-hidrolase, sorbitol, L-arabinose, fermentação com manitol e lactose) (Newprov, Pinhais). *E. coli* que cresceu em ágar com ceftriaxona foi verificada como β-lactamase com espectro estendido (ESBL) em ágar Muller-Hinton com discos combinados de ceftazidima (30 µg) com ceftazidima/clavulanato (30/10 µg) e cefotaxima (30 µg) com cefotaxima/clavulanato (30/10 µg). As bactérias não confirmadas como ESBL foram testadas usando discos de cefepima (30 µg), ceftaxitina (30 µg) e meropenem (10 µg) para AmpC e carbapenemase.

Como controle positivo, *E. faecalis* (ATCC 51299) foi usada para ensaios de vancomicina, alto nível de resistência à gentamicina e estreptomicina e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) para ensaios de ESBL. A suscetibilidade ou resistência foi determinada usando pontos de interrupção estabelecidos pelo CSLI (2019). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC), pela presença/ausência de resistência.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização físico-química das amostras

O rio Belém gerou os mais baixos parâmetros de qualidade com mais altos níveis de DBO e DQO, esses dados sugeriram a presença constante de materiais orgânicos de origem antrópica nesta localidade. No entanto, este rio teve maior concentração de oxigênio dissolvido (Tabela 7), que pode ter ocorrido por conta do efeito de uma cascata de reoxigenação que ocorre na saída do lago do parque São Lourenço. Além disso, esse indicador depende da temperatura (BOLLMANN; DA MOTTA MARQUES, 2006), que pode ter influenciado significativamente as medições.

Tabela 7. Características físico-químicas das amostras de água dos rios Belém e Barigui.

	Rio Belém	Rio Barigui
pH	6,0	7,0
DQO (mg L⁻¹)	34	15
DBO (mg L⁻¹)	4	3
OD (mg L⁻¹)	6,05	3,23
Relação DQO/DBO	8,5	5,0
Saturação do OD (%)	68,7	35,5
Temperatura (°C)	22,5	19,4

Nota: DQO, demanda química de oxigênio; DBO, demanda biológica de oxigênio; OD, oxigênio dissolvido.

O pH tende a aumentar com o lançamento de esgotos e sua estabilização, o H⁺ e o CO₂ da respiração bacteriana formam ácido carbônico e carbonatos alcalinizando na água. Além disso, o pH tem uma relação direta com as velocidades de reação durante as atividades biológicas, sendo ideal para microorganismos entre 6,5 e 7,5 (SPERLING, 2005).

Além da matéria orgânica biodegradável, as análises de DQO quantificam mais compostos refratários, como substâncias húmicas. A decomposição desses compostos no ambiente ocorre mais lentamente, impactando gradualmente o consumo de oxigênio dissolvido (BOLLMANN; DA MOTTA MARQUES, 2006; DA COSTA MACHADO et al., 2017).

A relação entre DQO e DBO foi de 8,5 no rio Belém e 5,0 no rio Barigui (Tabela 7), indicando que a fração biodegradável da matéria orgânica era pequena e o restante

consistia em compostos orgânicos que não são facilmente degradáveis pela decomposição de microorganismos aeróbicos (SPERLING, 2005; DA COSTA MACHADO et al., 2017).

5.3.2 Validação do método

São mostrados na Figura 6 cromatogramas dos extratos das amostras com antibióticos a 10 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ para azitromicina, norfloxacina, ciprofloxacina, sulfametoxazol e 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para amoxicilina e doxiciclina.

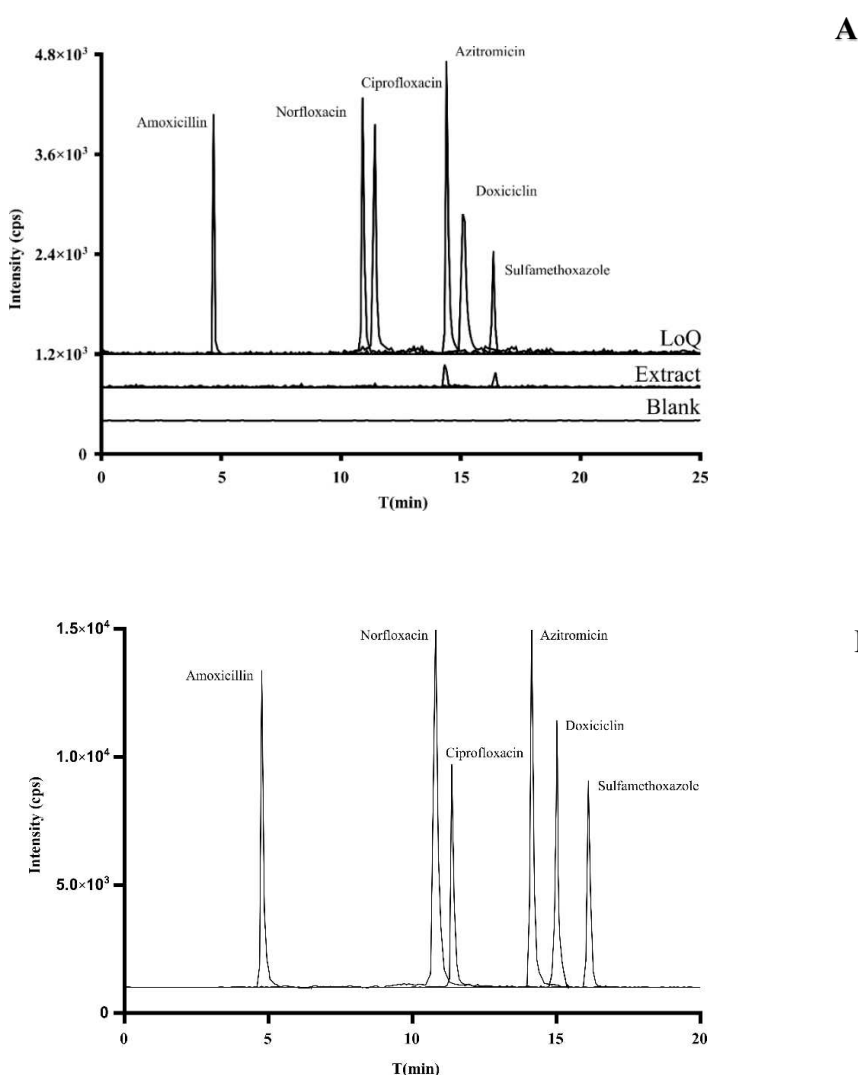


Figura 6. A- Cromatograma dos extratos da matriz com fortificação do limite de quantificação (LoQ) de antibióticos, matriz (extrato da água do rio), e fase móvel (Branco) no modo de ionização positiva. B- Cromatograma dos extratos da matriz com fortificação máxima da curva de calibração dos antibióticos.

Nota: Coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 com fase móvel água (A) e acetonitrila/água 95: 5 (v/v) (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio, com fluxo de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. O volume de injeção, 20 μL , temperatura do forno de coluna 30° C.

A comparação da inclinação de ambas as curvas (água ultrapura e água de superficial extraída) não gerou variações significativas (desvio padrão relativo, DPR <5%; teste t de Student, $p > 0,05$). Dados para LoD, LoQ, linearidade, recuperação, exatidão e precisão são mostradas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Parâmetros de validação do método HPLC - MS/MS

	t_R (min)	LoD ^a (ng L ⁻¹)	LoQ ^a (ng L ⁻¹)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linearidade (r)	Recuperação ^b % (DPR)	
						Fortificação no nível LOQ	Fortificação no nível superior
Amoxicillina	4,69	100	200	100–500	0,991	12,5 (7,2)	33,00 (3,2)
Azitromicina	14,11	14	20	10–60	0,999	48,8 (8,7)	63,43 (5,7)
Ciprofloxacina	11,25	10	20	10–60	0,999	42,36(3,98)	52,45(3,87)
Doxiciclina	14,90	100	200	100–500	0,994	96,56(12,5)	120 (1,17)
Norfloxacina	11,34	10	20	10–60	0,999	41,87 (6,98)	55,87 (2,67)
Sulfametoxazol	16,20	10	20	10–60	0,999	84,54 (5,74)	99,65 (4,87)

Notas: ^aLOD e LOQ com fator de concentração. ^bRecuperação usando água de superfície fortificada (em triplicata. DPR, o desvio padrão relativo é dado entre parênteses. t_R , tempo de retenção; LOD, limite de detecção; LOQ, limite de quantificação; r, coeficiente de correlação.

Tabela 9. Valores de precisão e exatidão obtidos em cada nível de concentração

	Exatidão		Precisão				
	ER % (n = 3)	Inter-dia DPR % (n = 6)			Intra-dia DPR % (n = 3)		
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	40	10	40	60	10	40	60
Azithromicina	-20,30	7,18	11,93	16,42	6,46	7,55	11,78
Ciprofloxacina	-26,72	7,88	5,33	6,44	7,17	5,55	5,51
Norfloxacina	-32,60	9,8	9,42	4,98	4,32	3,65	3,2
Sulfamethoxazol	2,65	14,01	11,42	5,65	8,77	4,99	2,65
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	300	100	300	500	100	300	500
Amoxicillina	-34,60	15,8	12,45	10,40	15,45	10,40	8,67
Doxiciclina	8,11	17,3	16,26	15,4	10,12	8,9	5,7

Nota: ER, erro relativo; DPR, desvio padrão relativo.

As concentrações de LoD e LoQ para todos os antibióticos estavam entre 10–100 ng L⁻¹ e 20–200 ng L⁻¹, respectivamente. Essas concentrações concordaram com dados da literatura (GRUJIĆ; VASILJEVIĆ; LAUŠEVIĆ, 2009; FERRER; THURMAN, 2012; KIM

et al., 2018). As curvas de linearidade revelaram coeficientes de correlação $> 0,99$ para todas as faixas de antibióticos, de acordo com as recomendações da ICH (ICH, 2005).

Para amostras ambientais, as recuperações geralmente são determinadas a partir da eficiência da extração, mas variam de acordo com as condições de extração (KIM et al., 2018). As recuperações de extração (33–120%) neste estudo foram reproduzíveis para todos os antibióticos. A amoxicilina apresentou a pior recuperação, mas foi reproduzível (DPR $< 7,2\%$) e refletiu dados da literatura (GRUJIĆ; VASILJEVIĆ; LAUŠEVIĆ, 2009; LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011; KIM et al., 2018).

Além disso, erros relativos (ER) descrevem o rendimento dos analitos obtidos após todas as etapas analíticas, incluindo pré-tratamento e análise instrumental. De acordo com a Diretiva 2002/657/CE, na faixa aceitável, os erros relativos para essa faixa de concentração são de -50 a 20 (Tabela 9).

Os dados de precisão inter e intra-dia (DPR $< 20\%$) estavam dentro dos limites, 4,98% - 17,30% e 2,65% - 15,45%, respectivamente (Tabela 9). Além disso, o inter-dia apresentou igualdade de variâncias e média ($p > 0,05\%$; teste t de Student e teste F). Então este método foi confiável e reproduzível para a análise quantitativa para todos os compostos estudados.

5.3.3 Antibióticos nas amostras de água dos rios

Os rios Belém e Barigui estão localizados dentro da área urbana da cidade de Curitiba, fazendo parte da paisagem urbana. São os rios principais das suas respectivas bacias hidrográficas. Além disso, são afluentes do rio Iguaçu, que fornece água para outras cidades do Paraná, Brasil (BOLLMANN; EDWIGES, 2008). Por esse motivo, foram coletadas amostras desses rios. As concentrações de amoxicilina, azitromicina, ciprofloxacina, doxiciclina, norfloxacina e sulfametoxazol nesses rios são mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações de resíduos de antibióticos encontrados nas amostras de águas superficiais dos rios Belém e Barigui.

Antibióticos	Concentração dos antibióticos ($\mu\text{g L}^{-1}$)					
	Rio Belém (DPR)			Rio Barigui (DPR)		
	1º semana	2º semana	3º semana	1º semana	2º semana	3º semana
Amoxicilina	0,18 (7,2)	0,33 (6,8)	1,21 (6,1)	4,63 (5,2)	2,03 (5,6)	4,11 (6,6)
Azitromicina	0,1 (4,3)	0,5 (3,2)	0,08 (4,8)	0,65 (3,3)	0,39 (4,3)	0,1 (4,2)
Ciprofloxacina	< 0,02 (0,1)	nd	nd	nd	nd	0,07 (2,7)
Doxiciclina	< 0,2 (0,1)	nd	nd	< 0,2 (0,1)	nd	nd
Norfloxacina	nd	0,11 (2,3)	nd	nd	0,13 (2,8)	< 0,02 (0,2)
Sulfametoxazol	nd	1,09 (2,2)	1,32 (3,1)	nd	1,8 (2,5)	0,42 (3,8)

Nota: nd, não detectado. DPR, Desvio padrão relativo.

Os resíduos de antibióticos podem entrar na rede de esgoto atingindo as estações de tratamento ou podem ser despejados diretamente nos recursos hídricos, contaminando diretamente o meio ambiente (KÜMMERER, 2001; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). Muitos antibióticos são provenientes de indústrias e, uma vez liberados no ambiente, persistem devido à ausência de microrganismos degradantes (KÜMMERER, 2001; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017). No ambiente, as chuvas solubilizam esses antibióticos nas fontes de água da superfície, permitindo que eles sejam filtrados no lençol freático (CHRISTIAN et al., 2003). Ao considerar uma taxa média (50 a 60%) de degradação é possível que toneladas de antibióticos entrem no ambiente a cada ano por meio de excreção (HU; ZHOU; LUO, 2010; MANAIA, 2017).

A amoxicilina foi detectada em todas as amostras de água dos dois rios, em concentrações variadas entre $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$ - $4,63 \mu\text{g L}^{-1}$. Vários estudos relataram a presença de amoxicilina em áreas urbanas, águas residuais, águas superficiais e subterrâneas (KÜMMERER, 2001; LOCATELLI; SODRÉ; JARDIM, 2011; KIM et al., 2018). Os dados dos rios de Curitiba foram superiores aos relatados por Kim et al. (2018) em águas residuais ($127,49 \text{ ng L}^{-1}$) e por Locatelli et al (2011) em águas superficiais (17 ng L^{-1}). No entanto, as concentrações de amoxicilina foram semelhantes aos achados de águas residuais na Tanzânia até $11,99 \mu\text{g L}^{-1}$ (MIRAJI et al., 2016; EBELE; ABOU-ELWAFA ABDALLAH; HARRAD, 2017).

O sulfametoxazol teve a segunda maior concentração no rio Belém ($1,32 \mu\text{g L}^{-1}$), esse fármaco é a sulfonamida mais frequentemente detectada nas águas superficiais. Já foi encontrada em concentrações variando de $0,005$ a $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$ em Maryland - EUA e $0,6 \mu\text{g}$

L⁻¹ na Alemanha (EBELE; ABOU-ELWafa ABDALLAH; HARRAD, 2017). A presença de sulfametoxazol nas águas superficiais é derivada principalmente de medicamentos para uso humano, aproximadamente 15% do fármaco é excretado inalterado pelo organismo. No entanto, a remoção desse composto hidrofílico pelas ETE é de aproximadamente 60% (TAMTAM et al., 2008).

A razão para maiores concentrações de amoxicilina quando comparada ao sulfametoxazol pode estar relacionada às taxas de metabolização. A amoxicilina é metabolizada a uma taxa de 10 a 20%, enquanto o sulfametoxazol é metabolizado a uma taxa de 85%, portanto, menos é excretada (CHRISTIAN et al., 2003).

A azitromicina foi o segundo antibiótico mais encontrado em amostras de água, também foi presente em todas as amostras coletadas, com concentrações variando de 0,08 µg L⁻¹ a 0,65 µg L⁻¹. Esses resultados nos rios Barigui e Belém foram consideravelmente mais altos do que em águas superficiais do rio Danúbio (55 ng L⁻¹), do rio Tamis (36 ng L⁻¹) e do lago Ocaga (81 ng L⁻¹) em Belgrado - Sérvia. No entanto, quando comparada às águas residuais desse país, a concentração de azitromicina (150 ng L⁻¹) é próxima ao encontrado (GRUJIĆ; VASILJEVIĆ; LAUŠEVIĆ, 2009).

A norfloxacin foi quantificada apenas na segunda semana nos dois locais, 0,13 µg L⁻¹ no rio Barigui e 0,11 µg L⁻¹ no rio Belém. Essas concentrações foram superiores às encontradas no rio Atibaia, em São Paulo, Brasil (2,2 ng L⁻¹) (Locatelli et al., 2011), e no Sena, Paris - França, em 30 ng L⁻¹ (TAMTAM et al., 2008). Observações semelhantes foram registradas para ciprofloxacina e doxiciclina. A maior concentração de ciprofloxacina foi detectada na terceira semana no rio Barigui, a 0,07 µg L⁻¹. Na segunda e terceira semana, o ciprofloxacino não foi detectado no rio Belém e, na segunda semana, não foi detectado no rio Barigui. A doxiciclina foi detectada apenas na primeira semana, nos dois locais.

Diferentemente da amoxicilina e do sulfametoxazol, esses compostos não foram quantificados nos dias de amostragem. Além disso, em solução aquosa esses fármacos são suscetíveis à foto-degradação, ou podem ser absorvidos em sedimentos e solos, porém esse mecanismo não é totalmente conhecido (GOLET; ALDER; GIGER, 2002).

5.3.4 Bactérias resistentes nas amostras de água dos rios

A resistência bacteriana foi investigada em bactérias coliformes (*E. coli*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) porque exercem os principais mecanismos de resistência bacteriana (MANAIA, 2017).

E. coli foi a bactéria com maior número de colônias resistentes encontradas em meios com amoxicilina, sulfametoxazol, norfloxacin e ciprofloxacina, nos dois rios e nas três semanas (Tabela 11). Esses resultados sugerem que durante o período do estudo, esse perfil de resistência permaneceu constante. A resistência à doxiciclina não foi constante durante as coletas, houve crescimento de colônias na primeira semana em amostras do rio Barigui e na terceira semana no rio Belém. Não houve crescimento de *Staphylococcus aureus* em nenhuma amostra e não houve presença de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos antibióticos testados.

Tabela 11. Bactérias resistentes aos antibióticos testados em diferentes locais e semanas.

		Média do número de bactérias UFC por 100 mL ⁻¹ (DPR x 10 ⁻³)			
Local	Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1º semana					
Rio Barigui	Controle*	5,90x10 ⁴ (4,13)	1,21x10 ⁴ (0,31)	5,63x10 ² (0,18)	0
	Amoxicilina	9,94x10 ³ (3,13)	0	-	0
	Ciprofloxacino	5,81x10 ³ (0,12)	1,25x10 ² (0,01)	0	0
	Doxiciclina	1,75x10 ³ (0,12)	-	-	0
	Norfloxacino	4,75x10 ³ (0,25)	1,88x10 ² (0,06)	0	0
	Sulfametoxazol	5,38x10 ³ (0,37)	-	-	0
	Ceftriaxone	0	-	-	-
	Vancomcina	0	0	0	-
Rio Belém	Controle*	5,24x10 ⁴ (2,69)	1,09x10 ⁴ (1,31)	1,88x10 ² (0,06)	0
	Amoxicilina	1,49x10 ⁴ (1,3)	0	-	0
	Ciprofloxacino	9,56x10 ³ (0,53)	0	0	0
	Doxiciclina	0	-	-	0
	Norfloxacino	8,44x10 ³ (3,13)	5,63x10 ² (0,18)	0	0
	Sulfametoxazol	6,44x10 ³	-	-	0

		(2,56)			
	Ceftriaxone	0	-	-	-
	Vancomcina	0	0	0	-
2º semana					
Rio Barigui	Controle*	8,76x10 ⁴ (2,19)	1,26x10 ⁴ (1,75)	5,63x10 ² (0,06)	0
	Amoxicilina	3,30x10 ⁴ (0,93)	-	-	0
	Ciprofloxacino	1,60x10 ⁴ (0,75)	6,25x10 ¹ (0,75)	0	0
	Doxiciclina	-	-	-	0
	Norfloxacino	1,2x10 ⁴ (0,65)	0	0	0
	Sulfametoxazol	3,08x10 ⁴ (2,31)	-	-	0
	Ceftriaxone	2,75x10 ³ (0,25)	-	-	-
	Vancomcina	0	2,50x10 ² (0,03)	0	-
Rio Belém	Controle*	4,93x10 ⁴ (6,38)	7,38x10 ³ (1,00)	2,50x10 ² (0,12)	0
	Amoxicilina	8,75x10 ³ (1,30)	0	-	0
	Ciprofloxacino	2x10 ³ (1,25)	0	0	0
	Doxiciclina	0	-	-	0
	Norfloxacino	1,31x10 ³ (0,31)	0	0	0
	Sulfametoxazol	4,63x10 ³ (0,75)	-	-	0
	Ceftriaxone	1,88x10 ² (0,06)	-	-	-
	Vancomcina	0	2,25x10 ² (0,03)	0	-
3º semana					
Rio Barigui	Controle*	2,28x10 ⁴ (1,14)	2,38x10 ³ (1,29)	6,25x10 ¹ (0,05)	0
	Amoxicilina	3,81x10 ³ (2,17)	0	-	0
	Ciprofloxacino	8,75x10 ² (0,48)	0	0	0
	Doxiciclina	0	-	-	0
	Norfloxacino	7,50x10 ² (0,41)	0	-	0
	Sulfametoxazol	5,75x10 ³ (2,97)	-	0	0
	Ceftriaxone	6,25x10 ¹ (0,07)	-	-	-
	Vancomcina	0	0	0	-
Rio Belém	Controle*	9,96x10 ⁴ (3,13)	8,31x10 ³ (0,68)	0	0
	Amoxicilina	4,49x10 ⁴ (1,88)	0	-	0
	Ciprofloxacino	2,32x10 ³	1,25x10 ²	0	0

		(0,31)	(0,03)		
	Doxiciclina	$7,50 \times 10^2$ (0,25)	-	-	0
	Norfloxacino	$2,94 \times 10^3$ (0,48)	0	-	0
	Sulfametoxazol	$4,74 \times 10^3$ (0,01)	-	0	0
	Ceftriaxone	$1,06 \times 10^3$ (0,18)	-	-	-
	Vancomicina	0	$1,25 \times 10^2$ (0,01)	0	-

Nota: *sem antibiótico; 0: sem crescimento; DPR, Desvio padrão relativo.

Nas placas de antibióticos seletivas para *E. coli*, a maior contagem de colônias foi para a amoxicilina na terceira semana no rio Belém (449 UFC mL^{-1}). Para ciprofloxacina e norfloxacina, ocorreu um crescimento maior na segunda semana de coleta no rio Barigui, com 160 UFC mL^{-1} e 120 UFC mL^{-1} , respectivamente. O sulfametoxazol, por outro lado, apresentou maior crescimento de colônias (57 UFC mL^{-1}) na terceira semana no rio Barigui (Tabela 11).

Na segunda e terceira semana, as placas de ceftriaxona apresentaram o maior crescimento e as cepas de ESBL foram detectadas em ambas as amostras (Tabela 11). As cepas que não confirmaram como ESBL foram resistentes à cefepima e ceftiofina e sensíveis ao meropenem, mostrando a presença de *E. coli* com ESBL + AmpC. A presença bacteriana de ESBL no meio ambiente é de grande preocupação ecológica (MANAIA, 2017), no entanto, há informações limitadas sobre os níveis e características de *E. coli* produtora de ESBL em rios poluentes (ORTEGA-PAREDES et al., 2019).

Enterococcus spp. foi resistente à norfloxacina e ciprofloxacina, mas não resistente à amoxicilina. Para *Enterococcus spp.* foi observada resistência na primeira coleta no rio Barigui, com um crescimento de $1,25 \text{ UFC mL}^{-1}$ para a ciprofloxacina e $1,88 \text{ UFC mL}^{-1}$ para a norfloxacina (Tabela 11). Além disso, foi encontrada maior resistência à ciprofloxacina (mais de três coletas), com a maior contagem de UFC na primeira coleta no rio Barigui e na terceira coleta no rio Belém (ambas $1,25 \text{ UFC mL}^{-1}$). Em relação à norfloxacina, as bactérias resistentes a esse antibiótico foram as que mais cresceram na primeira coleta do rio Belém ($5,63 \text{ UFC mL}^{-1}$) (Tabela 11).

Após a contagem, foram realizados testes fenotípicos para identificar espécies de colônias resistentes. Colônias resistentes à norfloxacina e ciprofloxacina foram identificadas

principalmente como *E. faecalis*. *Vagococcus spp.* foi identificado na primeira coleta do rio Belém (Tabela 12). *Vagococcus spp.* é encontrado na água do rio, com baixo potencial de virulência (PROCOP et al., 2017).

Tabela 12. Identificação das espécies de *Enterococcus spp.* presentes nas amostras de águas superficiais

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>Vagococcus spp</i>
Catalase	-	-	-	-
Bile esculina	+	+	+	+
Tolerância ao sal	+	+	+	+
Motilidade	-	+	+	+
Pigmento amarelo	+	+	-	-
Arginina di-hidrolase	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	+
L-arabinose	-	+	+	-
Lactose	+	+	+	-

Nota: (+) Positivo, (-) Negativo.

Enterococcus spp. também exibiram resistência à vancomicina, gentamicina e estreptomicina em amostras de ambos os rios. Estes foram identificados como *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecalis*. *E. faecalis* foi resistente apenas à vancomicina na terceira amostragem no rio Belém (Tabela 12). *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* expressam resistência intrínseca e intransferível à vancomicina, enquanto *E. faecalis* possui resistência transmissível, com alguma importância epidemiológica (PROCOP et al., 2017). As estirpes que exibem resistência de alto nível aos aminoglicosídeos não são mortas pela atividade sinérgica do agente β -lactama juntamente com um aminoglicosídeo. Acredita-se que esse alto nível de resistência seja mediado pelo *transposon*, facilitando sua transferência para outras bactérias (PROCOP et al., 2017).

Enterococcus spp. são mais prováveis que sejam selecionados na presença de antibióticos. Isso leva à geração de resistência das espécies, que infectam os seres humanos por contato direto com animais e ingestão de produtos de origem animal (ZOU et al., 2011). A resistência de muitos *Enterococcus spp.* é mediada por genes de resistência codificados

por plasmídeo. Esse grupo de bactérias é intrinsecamente menos suscetível a muitos antimicrobianos comuns. Além disso, essas bactérias geralmente causam infecções nosocomiais do trato urinário, bem como infecções de feridas (MANAIA, 2017). *E. faecalis* é frequentemente associada a infecções em animais e humanos imunocomprometidos, desencadeando bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningite e endocardite (ZOU et al., 2011).

Além disso, *E. coli* e *Enterococcus spp.* habitam principalmente o trato intestinal inferior de humanos e animais, e geralmente são descarregados no meio ambiente através de fezes ou urina. A grande presença desses microrganismos nas águas dos rios indica poluição fecal, particularmente *E. coli*, que é um indicador ambiental de contaminação fecal recente (BEAN et al., 2005). Alguns estudos relataram que cepas específicas de *E. coli* sobrevivem por longos períodos, potencialmente proliferando em ambientes extra-intestinais (BEAN et al., 2005; MANAIA, 2017).

A taxa de resistência bacteriana concorda com a concentração quantificada de antibióticos, sugerindo que a contaminação em águas superficiais pode ter influenciado a resistência bacteriana a antibióticos. Esses achados são consistentes com estudos anteriores, nos quais a distribuição de bactérias resistentes a antibióticos está relacionada à poluição fecal em rios urbanos (LUO et al., 2010; HAM et al., 2012). Baixas concentrações persistentes de antibióticos podem influenciar a seleção de genes de resistência (MANAIA, 2017). Além disso, outros estudos evidenciam a presença de bactérias resistentes em estações de tratamento de esgoto e água potável (ABRAHAM et al., 2007; BERGERON et al., 2015).

Os efeitos adversos dos antibióticos nas águas superficiais incluem populações microbianas prejudicadas, toxicidade para a vida e a seleção de bactérias resistentes a antibióticos (VARELA; MANAIA, 2013; MANAIA, 2017). Antibióticos, mesmo em baixas concentrações, independentemente de seu modo de ação, induzem a ativação transcricional de genes bacterianos críticos implicados na resistência a antibióticos (LUO et al., 2010; PRUDEN; ARABI; STORTEBOOM, 2012; EBELE; ABOU-ELWAFI ABDALLAH; HARRAD, 2017).

Este estudo mostrou que os ambientes aquáticos podem favorecer a evolução, disseminação de bactérias resistentes e surgimento de novos patógenos. Essa correlação positiva entre o uso social de antibióticos e o desenvolvimento de resistência a antibióticos

em bactérias patogênicas já foi descrita em outros estudos da literatura científica (IWANE et al., 2007; OUYANG et al., 2015; EBELE; ABOU-ELWafa ABDALLAH; HARRAD, 2017). Por esses motivos, pesquisas adicionais são necessárias para investigar e monitorar os efeitos a longo prazo da descarga de águas residuais nos rios urbanos e outros recursos naturais (VARELA; MANAIA, 2013; MANAIA, 2017).

5.4 CONCLUSÃO

Este capítulo evidenciou a presença de antibióticos e bactérias resistentes aos antibióticos quantificados nos rios Belém e Barigui da cidade de Curitiba - Brasil. As concentrações de antibióticos foram maiores do que os relatados por outros estudos internacionais para águas superficiais, sugerindo maior contaminação com efluentes domésticos em nossos locais amostrados.

As bactérias das amostras de águas superficiais dos rios foram resistentes a um ou mais antibióticos (multirresistentes), e em algumas mostras de água coletadas foram detectadas bactérias vancomicina resistente, ESBL, AmpC e alto nível de resistência a aminoglicosídeos. É possível que os antibióticos presentes nessas amostras sejam provenientes de efluentes domésticos, o que pode estar contribuindo para o surgimento e disseminação da resistência bacteriana. Esses dados reforçam a importância de um saneamento universal adequado.

6. CAPÍTULO III

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM ÁGUA TRATADA EMPREGANDO FOTÓCATALISE HETEROGÊNEA

Trabalho realizado em parceria com a Pós - Graduação em Química da
Universidade Federal do Paraná, sob supervisão o Prof. Dr. Patricio Guillermo-Peralta
Zamora

6.1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são um amplo grupo de moléculas orgânicas complexas com diferentes mecanismos de ação (MELO et al., 2009). A norfloxacin, ciprofloxacina, azitromicina e doxicilina são utilizadas em medicina humana e veterinária, devido ao seu amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de adequadas propriedades de ingestão oral (BABÍĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013; ADAMEK; BARAN; SOBCZAK, 2016; BABÍĆ et al., 2017; ČIZMIĆ et al., 2019). Por outro lado, o grande aumento observado na prescrição de antibióticos, a qual muitas vezes se mostra desnecessária, contribui indiretamente com a contaminação dos ambientes aquáticos gerando efeitos nocivos bem caracterizados (BABÍĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013).

Após a administração terapêutica, os antibióticos são parcialmente metabolizados no organismo, sendo uma parte eliminada inalterada e farmacologicamente ativa (MELO et al., 2009; BABÍĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013), o que faz com que o esgoto doméstico seja um importante veículo deste tipo de contaminação. Desta forma, os antibióticos podem entrar no ambiente aquático por diferentes rotas (HERNÁNDEZ et al., 2007; IWANE et al., 2007; YUAN et al., 2016) com destaque para o lançamento de esgoto *in natura* e de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) doméstico e hospitalar (FENT; WESTON; CAMINADA, 2006; IWANE et al., 2007; AUS DER BEEK et al., 2016; EBELE; ABOU-ELWafa ABDALLAH; HARRAD, 2017) o que faz com que estes resíduos representem uma fonte de poluição ininterrupta dos ambientes aquáticos.

Universalmente, o tratamento de esgoto envolve o uso de processos biológicos, aeróbios e anaeróbios, o que viabiliza o tratamento de grandes volumes de resíduo, com elevada eficiência na remoção de matéria orgânica biodegradável e com baixo custo (HAQUE; MUNEEER, 2007; MELO et al., 2009; CHEN; CHU, 2012; BABÍĆ et al., 2017; HU et al., 2020). Entretanto, estes processos se mostram deficientes na remoção de poluentes orgânicos resistentes e em baixa concentração, o que tem servido de incentivo para a busca de novas alternativas de tratamento que promovam a remoção dos fármacos, tanto em águas residuárias como de abastecimento (BABÍĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017).

Dentro deste contexto destacam processos de oxidação avançada (POAs), que apresentam elevada eficiência na degradação de inúmeros poluentes orgânicos recalcitrantes

em solução aquosa, permitindo, em muitos casos, a sua completa mineralização (BABIĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013; LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017; HU et al., 2020). Estes processos se fundamentam na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente de radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), que apresenta um elevado potencial padrão de redução ($E^0 \text{OH}/\text{OH}\cdot$: 2,8 eV) e, portanto, uma elevada capacidade oxidativa.

Grande parte das EROs são de natureza radicalar, o que faz com que apresentem elevada reatividade e, em consequência, baixíssimo tempo de meia vida. Por este motivo, estas formas radicalares devem ser geradas *in situ*, recorrendo-se a processos catalíticos homogêneos ou heterogêneos, assistidos por radiação ou não. Nos processos de fotocatalise heterogênea, por exemplo, radicais hidroxila são gerados pela ação da radiação, usualmente ultravioleta, em suspensões contendo óxidos semicondutores (MIRANDA-GARCÍA et al., 2011; ZHANG et al., 2012), usualmente dióxido de titânio (TiO_2) (LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017). A partir da década de 1990, o processo foi maciçamente utilizado em estudos de degradação de poluentes ambientais, incluindo antibióticos, transformando-se em uma alternativa promissora no tratamento de águas e efluentes de estações de tratamento de esgoto (LEE; PALANIANDY; DAHLAN, 2017).

Em função dos argumentos antes salientados, o presente capítulo objetiva a avaliação preliminar do processo de fotocatalise heterogênea (TiO_2/UV), em relação a degradação de antibióticos (norfloxacin, ciprofloxacina, azitromicina e doxiciclina) em solução aquosa.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Reagentes e Insumos

Os padrões químicos de norfloxacin (99,8%) e ciprofloxacina (93,4%) foram adquiridos da Zhejiang Langhua Pharmaceutical Co. (Linhai, Zhejiang, China). Doxiciclina (98,7%) foi adquirida do Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Baviera, Alemanha) e a azitromicina (94,4%) da Alembic Pharmaceuticals Limited (Panelav, Gujarat, Índia). Acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Hessen, Alemanha). O ácido fórmico (98%) e o formiato de amônio (99%) foram adquiridos na Sigma – Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). A água ultrapura foi obtida usando um sistema de purificação de

água Milli-Q Merck Millipore (Bedford, Massachusetts, EUA). As soluções padrão de estoque desses compostos foram preparadas de acordo com a solubilidade em metanol e/ou água (1 mg mL^{-1}) e armazenadas a -40°C . As soluções de trabalho foram preparadas de fresco em água e acetonitrila (50:50, v / v), contendo ácido fórmico a 0,1% e formiato de amônio $5 \mu\text{M}$.

6.2.2 Tratamento fotoquímico

Os experimentos de fotocatalise foram realizados em um reator fotoquímico de bancada encamisado (Figura 7), com capacidade de 250 mL, equipado com agitação magnética e resfriamento por água. A radiação foi fornecida por uma lâmpada a vapor de mercúrio OSRAM de 125W, inserida na solução com a proteção de um bulbo de quartzo (radiação UV-C), sendo utilizado o processo em sistema não-contínuo (batelada). Para os experimentos amostras de água, os analitos foram adicionados separadamente (experimentos de componente único). Foram preparados 200 mL de solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada antibiótico em água MilliQ (pH 3), 50 mg de catalizador TiO_2 (Aeroxide P-25) e submetidas a irradiação por 30 min. Aliquotas de 2mL foram coletadas em intervalos regulares, filtradas em membrana politetrafluoretileno (PTFE) $0,22 \mu\text{m}$ e analisadas. As amostras foram protegidas da luz até o experimento. Todas as experiências foram realizadas em triplicatas e posteriormente submetidos ao método HPLC - MS/MS já descrito no capítulo 2.

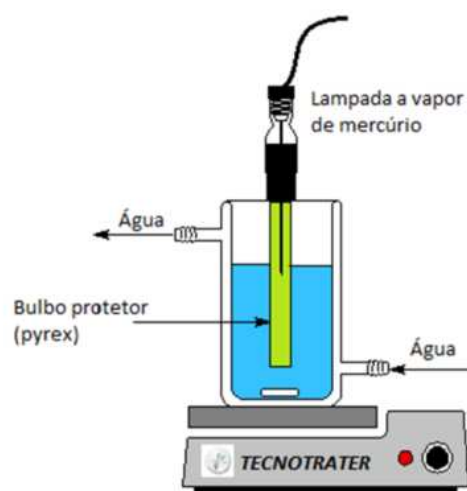


Figura 7. Representação do reator fotoquímico de bancada utilizado. Fonte: Liz (2013)

6.2.3 Análise das amostras por HPLC - MS/MS

A determinação das espécies de interesse foi realizada pelo sistema já descrito nos capítulos anteriores: um sistema Agilent 1200 HPLC, acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo Applied Biosystems/MDS Sciex API 3200 e uma fonte de íons de ionização por ESI operado no modo positivo. A quantificação foi realizada no modo de MRM e as transições dos íons podem ser observadas na Tabela 1. Os parâmetros individuais dos compostos para azitromicina, ciprofloxacina, doxiciclina e norfloxacin foram: CE: 49, 45, 23, 21 respectivamente; EP: 4,5, 8, 5, 10 respectivamente; CEP: 34, 24, 27, 24 respectivamente; DP: 56, 31, 26, 31 respectivamente; CXP: 14, 4, 34, 6 respectivamente. Os parâmetros da ESI no modo positivo foram os seguintes: CUR, 18 psi; CAD, 6 psi; IS, 5500 V; GS1, 45 psi; GS2, 50 psi; e temperatura, 650 ° C. O nitrogênio foi produzido usando um gerador de nitrogênio de alta pureza para os gases CUR, GS1, GS2 e CAD.

A coluna usada para a separação foi o Agilent Zorbax® Eclipse XDB-C8. A fase móvel consistiu em água (A) e acetonitrila/água 95: 5 (v/v) (B), ambos contendo ácido fórmico a 0,1% e formiato de amônio 5 µM. Uma eluição em gradiente começou com 10% de B e aumentou linearmente de 10% de B para 100% de B por 0-35 minutos. A vazão foi de 400 µL min⁻¹ e o volume de injeção 20 µL. A aquisição dos dados foi realizada com o MS Workstation pelo software Analyst® SCIEX versão 1.4.2.

Os parâmetros validados já foram descritos nos capítulos 2, destacando a linearidade do método feita através de sete diferentes níveis de concentração, na faixa de 10 a 60 µg L⁻¹ para azitromicina, norfloxacin, ciprofloxacina e de 100 a 500 µg L⁻¹ para doxiciclina.

6.2.4 Ajuste do perfil cinético

Os perfis cinéticos foram ajustados utilizando as equações de uma cinética de ordem zero (Equação 1), primeira ordem (Equação 2) e segunda ordem (Equação 3) utilizando-se o programa Origin 9.0.

$$C = C_0 - kt \quad (1)$$

$$C = C_0 * e^{(-kt)} \quad (2)$$

$$C = C_0 / (1 + ktC_0) \quad (3)$$

Onde:

C = concentração do substrato (mol L⁻¹), no tempo t,

C₀ = concentração inicial do substrato (mol L⁻¹),

k = constante de velocidade e

t = tempo de reação (s).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

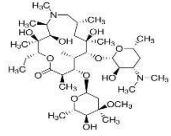
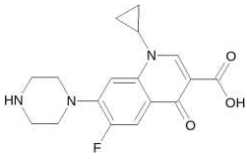
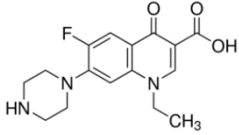
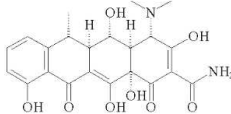
6.3.1 Degradação por fotocálise heterogênea

Em geral, estima-se que a adsorção preliminar dos substratos na superfície do fotocatalisador seja uma das etapas de maior relevância no processo de fotocátalise (HU et al., 2020), em razão de favorecer a aproximação das moléculas alvo aos sítios geradores de radical hidroxila. Desta forma, é um consenso praticamente universal que, uma vez que o radical hidroxila é formado na superfície do fotocatalisador, a fotocátalise somente possa degradar substratos previamente adsorvidos no fotocatalisador (PALMISANO et al., 2007).

Este processo de adsorção é marcadamente dependente do pH, parâmetro que influencia, não apenas as características físico-químicas da superfície do catalisador, mas também a estrutura do substrato, em decorrência de alteração do equilíbrio de protonação/desprotonação (HAQUE; MUNEER, 2007; HU; ZHOU; LUO, 2010; MIRANDA-GARCÍA et al., 2011; CHEN; CHU, 2012).

Desta forma, estima-se, por exemplo, que baixos valores de pH possam favorecer a adsorção de fluoroquinolonas (PENG et al., 2012). Neste estudo, taxas de adsorção de aproximadamente 75%, 88%, 67% e 75% foram observadas para ciprofloxacino, norfloxacin, azitromicina e doxiciclina, respectivamente. Trata-se de um resultado coerente com a estrutura dos antibióticos (TABELA 13) e com as características superficiais do TiO₂ no pH de trabalho.

Tabela 13. Principais propriedades físico-químicas dos padrões utilizados.

Composto	Estrutura	pK_a^*
Azitromicina		8,74
Ciprofloxacino		6,0; 8,8
Norfloxacino		6,34; 8,75
Doxiciclina		3,5; 7,7; 9,5

Note*: PubChem (2020)

De acordo com os resultados apresentados na Figura 8, a degradação dos antibióticos por fotocatalise TiO_2/UV se processou rapidamente, o que permitiu remoções praticamente completas em tratamentos da ordem de 5 min. Trata-se de um resultado que confirma a elevada atividade fotocatalítica do TiO_2 , o que o qualifica como uma excelente alternativa para a degradação de poluentes orgânicos em solução aquosa (HAQUE; MUNEER, 2007).

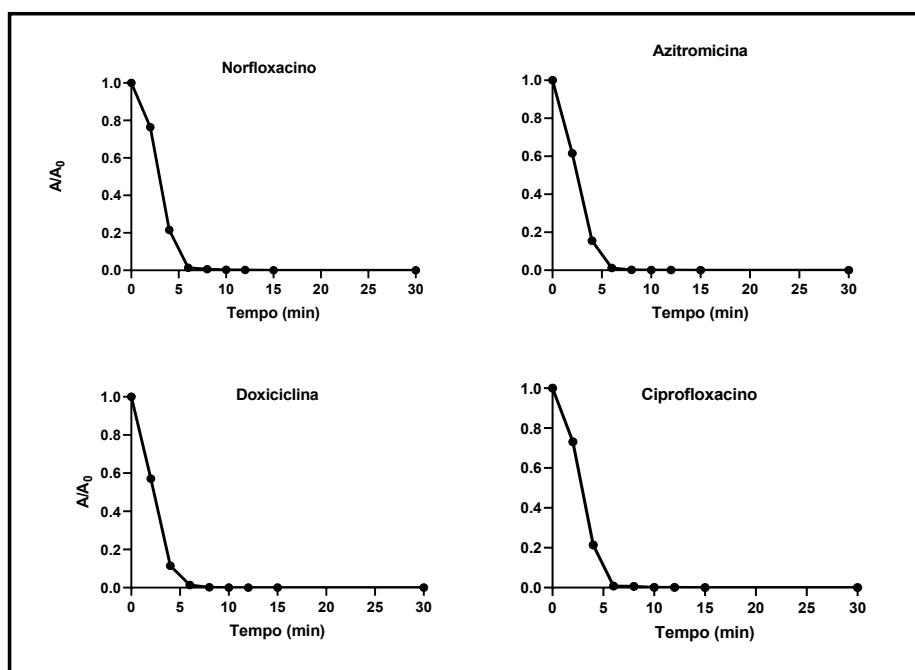


Figura 8. Remoção de ciprofloxacino, norfloxacino, azitromicina e doxiciclina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em água MilliQ, pH 3) durante a fotocatalise mediada por TiO_2 (50 mg) e assistida por radiação UV submetidas por 30 min.

Nota: Análise por HPLC-MS/MS com coluna Zorbax Eclipse XDB-C8 com fase móvel água (A) e acetonitrila/água 95: 5 (v/v) (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio, com fluxo de $400 \mu\text{L min}^{-1}$. O volume de injeção, $20 \mu\text{L}$, temperatura do forno de coluna 30°C . LoQ do método foi $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para ciprofloxacino, norfloxacino e azitromicina $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para doxiciclina.

Nos processos de fotocatalise assistidos por radiação de elevada energia (ultravioleta) uma parcela da degradação observada pode ser atribuída a processos de fotólise, viabilizados por absorção de radiação por parte da molécula alvo. Ciprofloxacino e norfloxacino, por exemplo, embora resistentes à hidrólise e à elevadas temperaturas, possuem grupos cromóforos que viabilizam a absorção de radiação e a sua degradação por fotólise (BABIĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013; BABIĆ et al., 2017). Entretanto, a degradação fotolítica costuma apresentar cinéticas bem menos favoráveis do que as observadas na fotocatalise, o que permite admitir que grande parte da degradação observa seja devida às reações desencadeadas pelas formas radicalares que surgem durante a fotocatalise.

Pesquisas prévias mostraram que a fotocatalise é eficiente na degradação das fluoroquinolonas (ciprofloxacino e norfloxacino) em água (MELO et al., 2009; CHEN; CHU, 2012; HU et al., 2020). De acordo com esses autores, a fotodegradação de

fluoroquinolonas ocorre provavelmente no anel piperazina, átomo F, grupo carboxila e grupo ciclopropila. Porém, sob condições ácidas a clivagem primeiramente ocorre no anel da piperazina. Esses estudos sugerem também algumas vias de degradação das fluoroquinolonas e indicam que o produto final da fotocatalise da ciprofloxacina exibe uma menor atividade antibacteriana, sendo, assim, menos prejudicial ao meio ambiente (CHEN; CHU, 2012; HU et al., 2020).

Para azitromicina, outro estudo propõem que a degradação pode ser descrita como clivagem dos amino-açúcares do anel de lactona cíclico e degradação adicional do próprio anel de lactona (ČIZMIĆ et al., 2019), processo este que seria mais favorecido em pH próximo de 10 (BABIĆ et al., 2017; ČIZMIĆ et al., 2019). Se observarmos os resultados do presente trabalho, a azitromicina foi o antibiótico que menos adsorveu no catalisador enquanto os outros antibióticos apresentaram mais adsorção no catalizador.

A azitromicina, como representante da classe dos macrólídeos, é um antibiótico que exibe toxicidade quando em ambiente aquático e apresenta baixa taxa de remoção em estações de tratamento. Para este antibiótico, a fotocatalise também se mostrou uma técnica promissora. A literatura apresenta poucos dados sobre os possíveis produtos de degradação da azitromicina, mas indica que eles não são produtos tóxicos (ČIZMIĆ et al., 2019). Assim como para doxiciclina, os produtos de degradação são menos ativos em relação ao antibiótico, porém pouco se sabe sobre suas rotas de degradação (ADAMEK; BARAN; SOBCZAK, 2016).

O estudo apresentou a degradação de antibióticos em concentrações de traços, ou seja, aquelas que podem ser encontradas no meio ambiente. Outros estudos já mostram que o tempo e a porcentagem de remoção de antibióticos se alteram consideravelmente com a concentração presente do analito (ČIZMIĆ et al., 2019).

Com base nos resultados apresentados, é possível ver que a fotocatalise com TiO_2 é uma abordagem promissora para purificação da água. A inércia biológica e química, ausência de toxicidade e estabilidade em longo prazo do catalizador confirmam a eficácia dessa ferramenta para remoção de antibióticos da água (MELO et al., 2009; BABIĆ; PERIŠA; ŠKORIĆ, 2013; BABIĆ et al., 2017). Com isso, é possível garantir a completa mineralização dos compostos-alvo em concentrações de traços, minimizando a formação de produtos intermediários e final tóxicos.

6.3.2 Cinética de degradação

O ajuste cinético das reações de fotocatalise contribui com o entendimento do mecanismo pelo qual a degradação acontece. De modo geral, admite-se que a fotocatalise heterogênea obedece ao mecanismo de Langmuir–Hinshelwood. O mecanismo de Langmuir-Hishelwood é utilizado em catálise heterogênea, que pressupõe a reação entre duas espécies quimiossorvidas no mesmo sítio de adsorção (LEVINE, 2009).

Como a cinética de reações é um estudo complexo, vários parâmetros devem ser levados em consideração, incluindo as características do meio reacional (pH, concentração do reagentes, capacidade de absorção da solução), condições fluidodinâmicas (vazão de oxigênio e de alimentação do reagente), o catalisador (semicondutor e sua concentração) e as características do reator e campo de radiação (comprimento de onda e radiação que chega ao fotorreator). O efeito de todos esses parâmetros está incluído na constante cinética k (LEVINE, 2009).

Na tentativa de melhor entender o mecanismo, bem como extrair um valor numérico que facilite a comparação dos processos, o perfil de degradação foi ajustado a uma equação de primeira ordem para todos os analitos, pois apresentou o melhor coeficiente de determinação: norfloxacino ($k = 0,006 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $R^2 = 0,925$); azitromicina ($k = 0,0065 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $R^2 = 0,966$); ciprofloxacino ($k = 0,005 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $R^2 = 0,953$); doxiciclina ($k = 0,005 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, $R^2 = 0,928$) (Figura 9). A degradação fotocatalítica de muitas moléculas e compostos orgânicos seguem à cinética de primeira ordem.

A reação de primeira ordem ocorre quando a velocidade da reação depende da concentração do catalisador. A degradação é diretamente proporcional à concentração existente de catalizador ao longo do tempo (NUDELMAN, 1975). Como mostrado na Figura 9, os valores das constantes de velocidade são valores próximos sugerindo uma cinética de degradação similar. A fotocatalise heterogênea é uma tecnologia extremamente útil para a fotodegradação de compostos orgânicos em baixas concentrações, como nos casos dos antibióticos estudados.

Sugere-se a condução de estudos posteriores e mais completos em relação à cinética de degradação desses antibióticos, permitindo identificar os intermediários, as vias de degradação e testes de toxicidade para dimensionar o impacto dessas substâncias no ambiente.

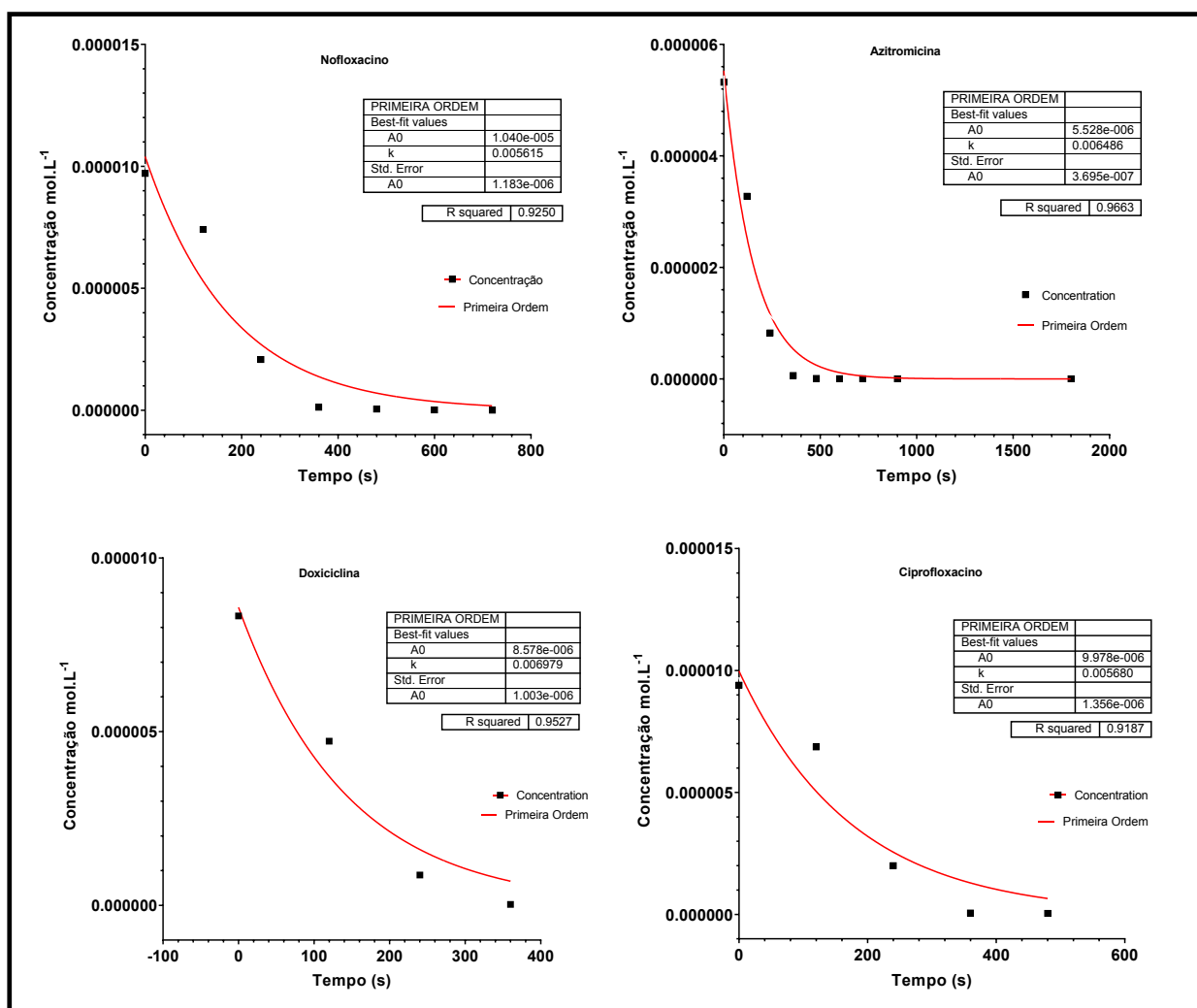


Figura 9. Perfil de degradação por fotocatalise dos antibióticos estudados em solução de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água MilliQ (pH 3), 50 mg de TiO_2 (Aeroxide P-25) e submetidas a irradiação por 30 min.

6.4 CONCLUSÃO

Este capítulo mostrou uma elevada capacidade do processo fotocatalítico, mediado por 50 mg TiO_2 e assistido por radiação UV, em degradar 100% uma solução de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de azitromicina, ciprofloxacino, doxiciclina e norfloxacino em solução de água MilliQ (pH 3). Verificou-se a alta taxa de adsorção nos analitos no catalizador (aproximadamente 75% para ciprofloxacino, 88% para norfloxacino, 67% para

azitromicina e 75% para doxiciclina) e completa degradação em menos de 10 minutos de irradiação. O método pode ser uma alternativa econômica e viável para tratamento de água. Além disso, o estudo aponta a necessidade de mais trabalhos elucidando as vias de degradação e testes de toxicidade para substâncias intermediárias e finais.

7. CAPÍTULO IV

INIBIÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ASSOCIADA AO LODO ATIVADO POR METAIS EM TRANSIÇÃO

Trabalho realizado durante o estágio de
doutorado sanduíche em Trier – Alemanha sob supervisão o Prof. Dr. Klaus Fischer.

7.1 INTRODUÇÃO

Nas ETE a maioria dos componentes orgânicos das águas residuais é biodegradada na fase de tratamento biológico, p. ex. no processo de lodo ativado, pelas enzimas dos microrganismos (ARNOSTI et al., 2014; FISCHER; MAJEWSKY, 2014). Os tipos de enzimas envolvidos na degradação do esgoto dependem, principalmente, da natureza das substâncias a serem degradadas (substratos enzimáticos) e dos microrganismos presentes nele (GARCIA-RODRÍGUEZ et al., 2014; KRAH et al., 2016). A eficiência da degradação enzimática e da atividade catalítica é influenciada por condições externas do processo, como temperatura, pH e tecnologia utilizada no tratamento de efluentes. Existem outros fatores que podem atuar aumentando, como por exemplo, co-fatores e coenzimas (“ativadores” ou “efetores positivos”) ou inibindo-a (“inibidores” ou “efetores negativos”) a atividade catalítica (FISCHER; MAJEWSKY, 2014; KOLVENBACH et al., 2014).

As enzimas hidrolíticas têm a capacidade de controlar a taxa de degradação e disponibilização dos substratos para o extrato microbiano, atuando, assim, como indicadores funcionais do efluente (KRAH et al., 2016). Dentre as hidrolases existentes no lodo, as fosfatases são a segunda maior classe de enzimas desta matriz, tendo grande importância nos processos de degradação biológica (FISCHER; MAJEWSKY, 2014). Elas são responsáveis pela degradação hidrolítica de nucleotídeos e fosfoproteínas, o que permite a liberação de fosfato inorgânico (YU et al., 2007; BURGESS; PLETSCHE, 2008; KRAH et al., 2016). Além disso, as fosfatases tem potencial para degradar ésteres sintéticos do ácido fosfórico presentes em surfactantes e compostos orgânicos sintéticos (incluindo medicamentos), porque esses compostos atuam competitivamente com os substratos naturais (YING, 2006; KRAH et al., 2016).

Um mecanismo regulador natural da atividade da fosfatase é a inibição de íons fosfato (inibição do produto). A inibição é fisiologicamente sensível, uma vez que o suprimento suficiente de fosfato ao organismo produtor de fosfatase não é necessário para a hidrólise do éster de ácido fosfórico (BURGESS; PLETSCHE, 2008; SHARMA; PAL; PRASAD, 2014).

Oxoanions como vanadato, molibdato e tungstênio, podem inibir a fosfatase alcalina, porque possuem características isoeletrônicas do ortofosfato (MAKINEN, 1985; STANKIEWICZ; GRESSER, 1988; FOSTER et al., 1998; CRANS, 2015; DANIKOWSKI;

CHENG, 2018). Suspeita-se que esses efeitos inibitórios também possam ocorrer nas reações enzimáticas do lodo ativado durante o tratamento de águas residuais, levando, possivelmente, a uma redução da degradação de compostos orgânicos naturais. Essa influência negativa na atividade da fosfatase microbiana ocorre porque há um mecanismo de concorrência ao local catalítico da enzima, sendo os oxianions degradados antes do que o substrato primário (JACKSON; TYLER; MILLAR, 2013).

Entretanto, a ocorrência de micropoluentes nas águas residuais e sua influência nos processos enzimáticos do lodo ainda não estão completamente elucidados. Sugere-se, neste contexto, a realização de estudos experimentais utilizando enzimas nativas, ou seja, enzimas ativas de amostras ambientais, para melhor compreensão dos processos enzimáticos (ARNOSTI et al., 2014).

Sabendo que a quantidade de inibição da degradação, de substratos naturais ou substratos sintéticos, tem potencial para ser utilizada como medida da atividade enzimática em efluentes. O objetivo deste capítulo foi verificar a inibição enzimática (IC₅₀) sofrida pela fosfatase presente no lodo ativado por oxoanions metálicos e exemplificar aplicação de um método fluométrico (substratos 4-MUF) para a análise da inibição enzimática em lodos ativados.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado entre novembro de 2018 a janeiro de 2019, as amostras de lodo ativado foram coletadas na principal ETE na cidade de Trier, durante o estágio de doutorado sanduíche na Alemanha. As águas residuais provêm principalmente de fontes municipais e contêm descargas de três produtores de vinho espumante, uma fábrica de tabaco e um laminador (descargas de águas residuais pré - tratadas).

As águas residuais passam pelas seguintes etapas de tratamento: peneira grossa, câmara da grade, clarificador primário, tratamento biológico, incluindo eliminação biológica de fósforo e precipitação de fosfato e secundária com clarificador. O estágio biológico consiste em seis canais de tratamento paralelo, cada um subdividido em seis tanques em série, denotados como cascatas. As cascatas podem ser aeradas ou agitadas sem aeração,

mantendo condições anaeróbia para permitir a desnitrificação. Normalmente, as cascatas um e dois na entrada dos canais de tratamento são operadas como tanques de desnitrificação. O lodo de recirculação é removido do último e re-alimentado na primeira cascata.

7.2.2 Preparo de amostra e pré-tratamento das amostras

O lodo usado no estudo foi coletado após tratamento secundário na ETE. As amostras de lodo ativado foram coletadas com um recipiente de polietileno de alta densidade (HDPE) de diferentes cascatas, por volta das oito da manhã. Todos os experimentos foram realizados com lodo ativado fresco. Uma alíquota (aproximadamente 100 mL) foi retirada da amostra de lodo ressuspenso e transferida para um ultra-som (Sonorex Digital 10P, Bandelin Electronic, Berlim, Alemanha) à temperatura ambiente com uma frequência de 35 kHz e potência 70% por 10 minutos. Essa etapa teve como objetivo liberar as enzimas fixadas no floco de lodo ativado. Na sequência o lodo sonicado foi diluído (1:5) em solução HEPES 0,05 M, pH 7,5. As amostras foram pré-aquecidas com as outras soluções padrões, em banho-maria (30 °C). Por fim, uma alíquota de 100 µL de lodo foi adicionada à microplaca em todos os poços, exceto no controle negativo.

7.2.3 Preparo de padrões

a) Substrato: O fosfato de 4-metilumbeliferil (4-MUF) obtido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) foi preparado em uma solução estoque de 10000 µM em HEPES (0,05M) como agente de diluição. As soluções foram protegidas da luz com papel alumínio e agitadas por 10 minutos. A concentração de trabalho foi diluída em 40 µM e aquecida em banho-maria a 30 °C. Os substratos permaneceram estáveis por pelo menos um dia quando armazenados na geladeira com papel alumínio.

b) Padrão: O MUF (metilumbeliferona) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) e preparado uma solução estoque de 10000 µM em 10 mL de metanol. A solução estoque foi armazenada refrigerada em um frasco envolvido em papel alumínio. Imediatamente antes do uso, a solução estoque foi diluída em concentrações 1000 µM, 25uM, 10uM, 1uM em

tampão HEPES (0,05M) para preparar as soluções de trabalho para o ensaio enzimático. Os substratos permaneceram estáveis por uma semana.

c) Tampão: O HEPES foi obtido da VWR (Pensilvânia, EUA) e 100 mM de HEPES foi dissolvido em 1L de água destilada. NaHCO_3 serviu para ajustar o pH. A solução estoque foi diluída em água destilada, conforme necessário, para produzir uma solução de trabalho de 50 mM para ensaios enzimáticos com pH 7,5. O valor de pH de 7,5 foi escolhido porque corresponde aproximadamente ao valor de pH da amostra (lodo ativado). A atividade máxima da fosfatase alcalina é alcançada em um pH mais alto.

d) Inibidores: Os inibidores vanádio e tungstênio foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Eles foram preparados tendo em vista as concentrações presumidas ou prováveis de inibidores inorgânicos nas águas residuais municipais, então foram escolhidas deliberadamente baixas concentrações de teste. Os inibidores foram preparados fazendo uma solução padrão de 10000 μM em 20 mL de HEPES. Imediatamente antes do uso, a solução estoque foi diluída nas concentrações 1000 μM , 100 μM , 10 μM , 1 μM em tampão HEPES para fazer as soluções de trabalho para o ensaio enzimático. As soluções permaneceram estáveis por uma semana.

7.2.4 Ensaio enzimático

A atividade da fosfatase foi fluorimetricamente medida (comprimento de onda de excitação até 350 nm/comprimento de onda de emissão a 450 nm), com e sem adição de potenciais inibidores, em um leitor multimodo de microplacas de 96 poços (Biotek Synergy HT, Bad Friedrichshall, Alemanha) após a adição de 4-MUF fosfato para as amostras de lodo pré-tratadas.

O fosfato de 4-MUF foi usado porque ao interagir com a enzima fosfatase forma o metilumbeliferona (MUF) podendo ser detectado com muita sensibilidade por fluorimetria. As amostras foram medidas em quintuplicadas e os controles em duplicatas. O protocolo de ensaios enzimáticos foi:

- a) Em três espaços na placa foi demarcado: "Amostra", "MUF padrão" e "sem lodo". Todos os poços da placa foram trabalhados com um volume total de 200 μL . Todas as soluções foram pré-incubadas em temperatura de banho-maria (30 °C).
- b) Para linhas do padrão MUF (G e H) as soluções de trabalho usadas foram de 25 μM , 10 μM , 1 μM . Foi pipetado o volume de padrão MUF apropriado para nos poços correspondentes (Figura 10): 100 μl de tampão nos poços G1 e H1 foram pipetados para obter uma concentração final de 0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF. Foram pipetados 20 μl de 1,0 μM de MUF e 80 μl de tampão nos poços G2 e H2, para obter uma concentração final de 0,1 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF. Foram pipetados 50 μl de 1,0 μM de MUF e 50 μl de tampão nos poços G3 e H3, para obter uma concentração final de 0,25 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF. Foram pipetados 10 μl de 10,0 μM de MUF e 90 μl de tampão nos poços G4 e H4 para obter uma concentração final de 0,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF. Foram pipetados 20 μl de 10,0 μM de MUF e 80 μl de tampão nos poços G5 e H5 para obter uma concentração final de 1,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF. Foram pipetados 30 μl de 10,0 μM de MUF e 70 μl de tampão nos poços G6 e H6, para obter uma concentração final de 1,5 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF. Foram pipetados 24 μl de MUF 25,0 μM e 76 μl de tampão nos poços G7 e H7 para obter uma concentração final de 3,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de MUF.
- c) Para linhas A, B, C, D, E e F da placa foram separadas as concentrações 1 μM , 10 μM , 100 μM e 1000 μM de solução inibidora. Foram pipetados a solução inibidora apropriada nos poços correspondentes (Figura 10): 50 μl de tampão nos poços por toda a coluna 1 foram pipetados para se obter uma concentração final de 0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de inibidor. Foram pipetados 20 μl de solução inibidora de 1,0 μM e 30 μl de tampão em toda a coluna 2 para obter uma concentração final de inibidor de 0,1 $\mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados 50 μl de solução inibidora de 1,0 μM em toda a coluna 3 para obter uma concentração final de inibidor de 0,25 $\mu\text{M L}^{-1}$ de inibidor. Foram pipetados 10 μl de solução inibidora de 10,0 μM e 40 μl de tampão em toda a coluna 4, para obter uma concentração final de inibidor de 0,5 $\mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados 20 μl de solução inibidora de 10 μM e 30 μl de tampão em toda a coluna 5, para obter uma concentração final de inibidor de 1,0 $\mu\text{M L}^{-1}$ de inibidor. Foram pipetados 50 μl de solução inibidora de 10 μM em toda a coluna 6 para obter uma concentração final de inibidor de 2,5 $\mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados 10 μl de solução inibidora de 100 μM e 40 μl de tampão em toda a coluna 7 para obter uma concentração final de

inibidor de $5,0 \mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados $20 \mu\text{l}$ de solução inibidora de $100 \mu\text{M}$ e $30 \mu\text{l}$ de tampão em toda a coluna 8 para obter uma concentração final de inibidor de $10,0 \mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados $50 \mu\text{l}$ de solução de inibidor de $100 \mu\text{M}$ em toda a coluna 9 para obter uma concentração final de inibidor de $25 \mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados $10 \mu\text{l}$ de solução inibidora de $1000 \mu\text{M}$ e $40 \mu\text{l}$ de tampão em toda a coluna 10 para obter uma concentração final de inibidor de $50 \mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados $15 \mu\text{l}$ de solução inibidora de $1000 \mu\text{M}$ e $35 \mu\text{l}$ de tampão em toda a coluna 11 para obter uma concentração final de inibidor de $75 \mu\text{M L}^{-1}$. Foram pipetados $30 \mu\text{l}$ de solução inibidora de $1000 \mu\text{M}$ e $30 \mu\text{l}$ de tampão em toda a coluna 12 para obter uma concentração final de inibidor de $100 \mu\text{M L}^{-1}$ de inibidor.

d) $100 \mu\text{L}$ de suspensão de lodo (diluição total 1:10 resultante) foram adicionados à microplaca em todos os poços, exceto no controle negativo (linha F) (Figura 10).

e) A microplaca pré-montada foi incubada a 30°C por 10 min.

f) Em seguida, $50 \mu\text{L}$ de solução de substrato (4-MUF) a $100 \mu\text{M}$ foi adicionada aos poços das linhas A-E para obter uma concentração final de substrato de $10 \mu\text{M L}^{-1}$ (Figura 10).

g) Após a montagem da microplaca, ela foi levada para um leitor de microplacas multimodo.

Este equipamento analítico permite a incubação da microplaca em temperatura constante e lê automaticamente as medições após um determinado intervalo de tempo sem haver interrupção da reação. Além disso, a principal vantagem do uso de substrato marcado com fluorimetria é que a formação do produto pode ser medida na microplaca sem extração e purificação anteriores. As medições foram realizadas a cada 2 minutos por 20 minutos. A configuração do ensaio pode ser observada na Figura 10.

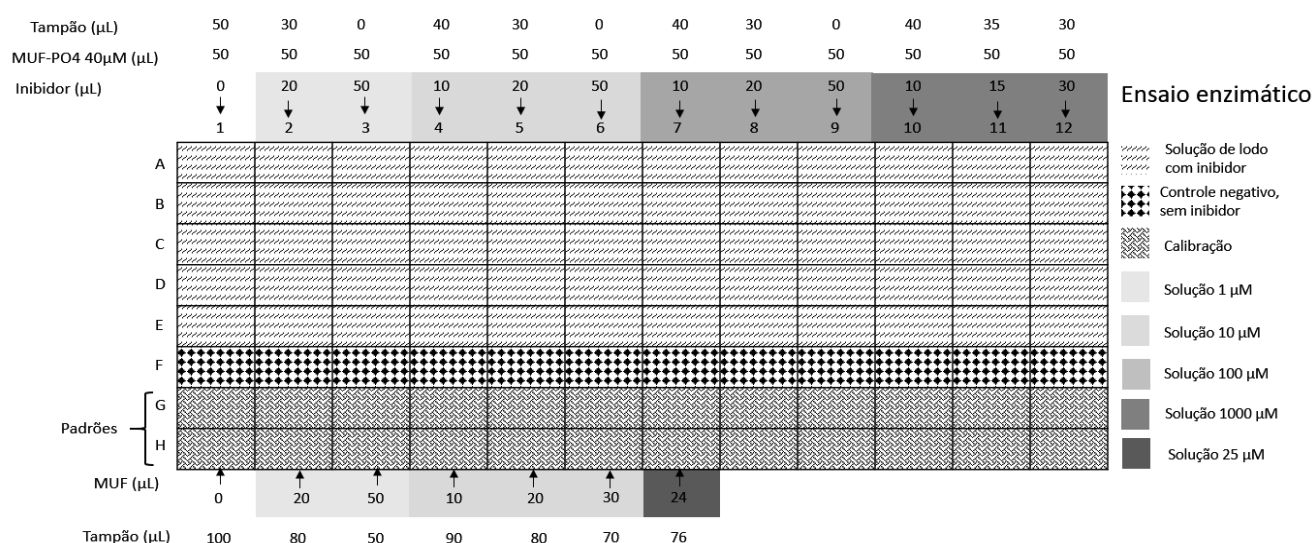


Figura 10. Representação esquemática das microplacas usadas para o estudo de inibição da enzima fosfatase pelo vanádio. Nota: 100 μL de suspensão de lodo pré-diluído foram adicionados à microplaca em todos os poços, exceto na linha de “F”.

Após concluir as leituras, o *software* (Biotek Synergy HT, Bad Friedrichshall, Alemanha) ajustou automaticamente uma linha de regressão aos dados e calculou a taxa de aumento da fluorescência em cada poço. A intensidade total de fluorescência foi calculada considerando os valores médios de intensidade de fluorescência de fosfato total dos poços para as amostras de interesse em um momento específico e subtraindo-os da intensidade média de fluorescência de fosfato total dos poços em branco no mesmo momento, e foram reportados como unidades de fluorescência arbitrárias. A linha de regressão linear foi analisada e avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2).

Os dados resultantes foram taxas de diminuição da fluorescência (unidades relativas de fluorescência produzidas min^{-1}), após conversão em substrato fluorescente, plotado contra as concentrações iniciais de substrato, a fim de produzir uma curva de IC50. Os valores absolutos das leituras de fluorescência em cada um dos 96 poços em cada um dos 11 ciclos de leitura (unidades relativas de fluorescência), foram usados para traçar as curvas de inibição.

7.2.5 Análise estatística

Para cada experimento (placa montada), um grupo de dados de cinco replicadas processadas em paralelo foram analisadas pela regressão não linear (*4-Parameter-Modell*) a fim de se obter, a média dos valores de IC50 experimentais para cada quintuplicada. Ou seja, cada série de testes foi analisada individualmente e em grupo, sendo calculado o coeficiente de determinação (R^2), valores médios e desvios padrões. Além disso, para dar conta das inomogeneidades naturais das amostras (lodo), todos os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas de duas vias e o teste post-hoc de Sidak foi realizado para comparação de médias. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. O software *Graphpad Prism 8* foi utilizado para análises estatísticas.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentrações constantes de substrato (MUF-fosfato) e concentrações variáveis de inibidor determinaram os valores de IC50. O princípio do experimento de inibição da fosfatase alcalina pelo aumento das concentrações de inibidores ocorre através de um ensaio enzimático fluorescente. O MUF-fosfato está ligado a uma fração fluorogênica e é adicionado às amostras de lodo. Durante a degradação do MUF-fosfato que é alterado pela fosfatase alcalina, a ligação entre a fração fluorescente e o MUF-fosfato é interrompida.

A fração fluorescente liberada do MUF-fosfato é, portanto, usada como uma avaliação indireta da atividade enzimática da fosfatase alcalina. Isso pode ser quantificado usando um leitor de microplacas para detectar a intensidade da fluorescência, assim medindo a velocidade da reação ($\Delta A / \text{min}$). Com a presença de um inibidor, a enzima não se liga ao MUF-fosfato e a liberação da fração fluorogênica não ocorre, diminuindo a absorbância.

A atividade enzimática pode ser subsequentemente quantificada com base nas concentrações de corante fluorescente no substrato (quantidades conhecidas de substrato sintético adicionado às amostras de lodo). Para esse fim, utiliza-se uma curva de diluição do padrão MUF (calibração) de intensidades de fluorescência para a fração fluorogênica do substrato.

A Tabela 14 compara o efeito do vanádio na atividade enzimática da fosfatase alcalina após 20 minutos, na faixa de concentração estudada (0,025-50 μM), a atividade máxima da enzima sem a introdução do inibidor e o IC_{50} obtido em cada experimento (placa). No total foram dez séries de experimentos realizados sob condições idênticas para o vanádio. A literatura científica indica o vanádio como um forte inibidor da enzima estudada, então foram escolhidas baixas concentrações (0,025-50 μM), afim de avaliar o mesmo resultado na enzima do lodo (STANKIEWICZ; GRESSER, 1988; DEL CARPIO et al., 2018). A Figura 11, apresenta o IC_{50} médio obtido nos dez experimentos.

Tabela 14. Quantidade de enzima disponível, faixa de concentração dos inibidores testados e IC_{50} de cada experimento realizados com vanádio (n=10) e tungstênio (n=9) como inibidores da enzima fosfatase presente em amostras de lodo da ETE de Trier-Alemanha.

	MUF Branco [$\mu\text{M/L}$] ^a ($\pm\text{DP}$)	Faixa de concentração dos inibidores [$\mu\text{M L}^{-1}$]	IC_{50} [μM] ^b ($\pm\text{DP}$)	R^2 (IC_{50}) ^b
Vanádio	1.45 \pm 0.09	0,025– 50	2.26 \pm 1.05	0,990
	1.52 \pm 0.03	0,025– 50	5.53 \pm 0.55	0,980
	1.67 \pm 0.04	0,025 – 50	2.41 \pm 1.23	0,973
	1.54 \pm 0.11	0,025– 50	2.88 \pm 1.38	0,967
	1.09 \pm 0.07	0,025– 50	1.59 \pm 1.12	0,986
	1.65 \pm 0,04	0,025 – 50	2.01 \pm 0.54	0,978
	3.81 \pm 0.16	0,025– 50	3.37 \pm 0.92	0,990
	3.80 \pm 0.11	0,025 -50	3.60 \pm 1.60	0,949
	2.35 \pm 0.22	0,025– 50	3.34 \pm 0.97	0,888
	2.85 \pm 0.51	0,025 – 50	1.81 \pm 0.34	0,978
Tungstênio	2.05 \pm 0.11	0,1 – 100	2.20 \pm 0.22	0,981
	1.25 \pm 0.04	0,1 – 100	3.88 \pm 1.49	0,992
	1.50 \pm 0.06	0,1 – 100	2.16 \pm 0.60	0,977
	1.72 \pm 0.04	0,1 – 100	2.72 \pm 1.34	0,992
	1.52 \pm 0.04	0,1 – 100	1.27 \pm 0.61	0,965
	1.11 \pm 0.05	0,1 – 100	1.51 \pm 0.35	0,986
	1.37 \pm 0.04	0,1 – 100	2.37 \pm 0.61	0,995
	2.48 \pm 0.18	0,1 – 100	3.20 \pm 1.38	0,993
	2.54 \pm 0.34	0,1 – 100	3.13 \pm 1.22	0,947

Nota: ETE, Estação de tratamento de esgoto; ^a Concentração final de MUF, quantidade de enzima disponível (n=5); ^bCalculado pelo *4-Parameter-Modell*; DP, desvio padrão; R^2 , Coeficiente de determinação.

Em 1970, foi relatado a inibição da (Na/K)-ATPase pelo vanádio, revelando consequências biológicas das semelhanças químicas entre o íon vanádio e o fosfato (DEL

CARPIO et al., 2018). O fosfato apresenta um estado de transição penta coordenado enquanto o vanádio atinge facilmente um número de coordenação de cinco, adquirindo uma geometria bipiramidal trigonal distorcida. Isso faz com que vanádio iniba as fosfatases com eficiência, a atividade de uma enzima que dependente de fosfato pode ser inibida quando o vanádio é incorporado no local ativo em substituição ao fosfato (DEL CARPIO et al., 2018).

A partir dos resultados na Figura 11, é possível concluir que o vanádio diminui a atividade da fosfatase alcalina após os 20 minutos do experimento, apesar de apresentar variações na taxa de inibição. Isso pode ocorrer devido à heterogeneidade natural das amostras de lodo nativo, uma vez que, sendo coletadas em dias diferentes, podem apresentar diferentes composições químicas e biológicas (FISCHER; MAJEWSKY, 2014).

Conforme demonstrado por Ozocko (2019), há uma diferença em experimentos conduzidos por lodo aclimatado e lodo nativo. Portanto, mesmo com essas variações naturais, ainda é melhor realizar experimentos com amostras reais (FERRO OROZCO; CONTRERAS; ZARITZKY, 2019). O lodo coletado em dias diferentes mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na inibição da fosfatase alcalina.

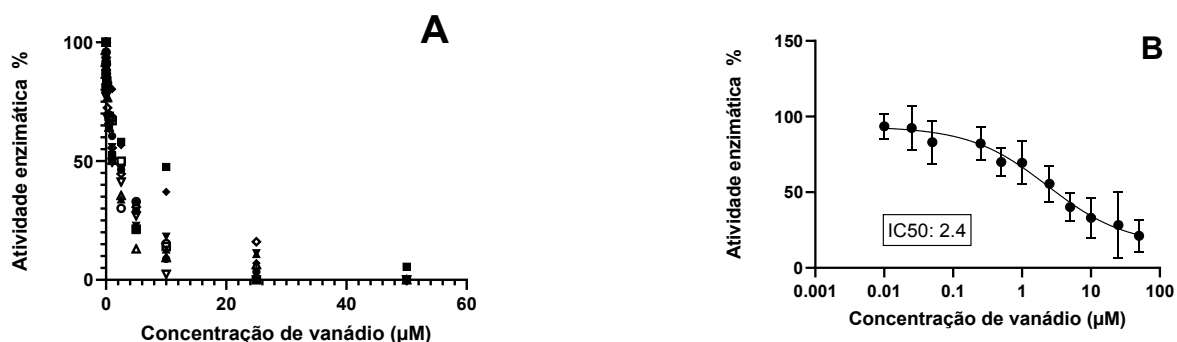


Figura 11. Experimentos ($n=10$) realizados com vanádio, como inibidor da enzima fosfatase presente em amostras de lodo da ETE de Trier-Alemanha. A- Concentração de vanádio versus resposta da atividade enzimática dos dez experimentos individualmente. B – IC50 médio obtido de todas as relações dose-resposta dos dez experimentos.

As nove experiências (placas) foram realizadas em condições idênticas para o tungstênio (Tabela 14). O efeito inibitório do tungstênio aumenta com o tempo, especialmente em baixas concentrações de inibidores, bem como no vanádio. Mesmo em

baixas concentrações, os valores de IC₅₀ estão na mesma ordem de magnitude que para o vanádio (Figura 12), contrariamente às expectativas, o efeito inibitório do tungstênio é similar ao vanádio (STANKIEWICZ; GRESSER, 1988).

Como o vanádio, o tungstênio também tem uma estrutura molecular que parece ser uma característica importante para o efeito da inibição. Ele também tem uma estrutura molecular que compete com os substratos de fosfato da enzima no local ativo da unidade catalítica. A estrutura tetraédrica desses compostos parece ser um fator comum importante para ações inibitórias (FOSTER et al., 1998).

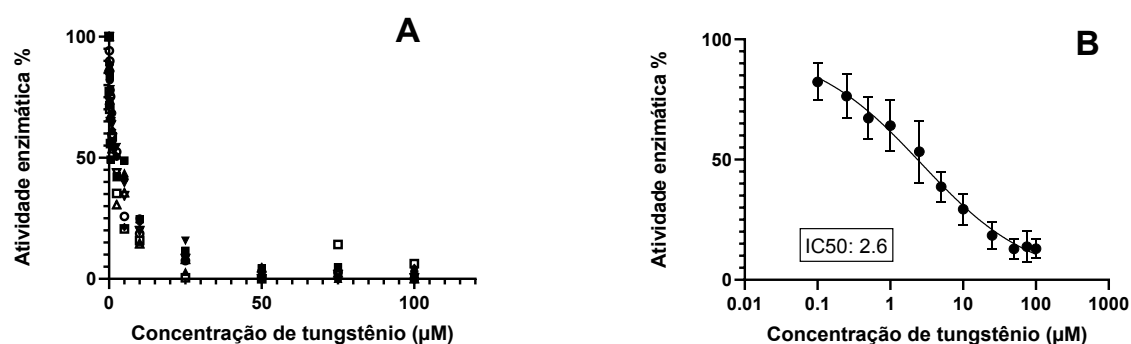


Figura 12. Experimentos (n= 9) realizados com tungstênio, como inibidor da enzima fosfatase presente em amostras de lodo da ETE de Trier-Alemanha. A- Concentração de tungstênio versus resposta da atividade enzimática dos nove experimentos individualmente. B – IC₅₀ médio obtido de todas as relações dose-resposta dos dez experimentos.

A comparação dos resultados com os dados da literatura é difícil devido à escassez de estudos enzimáticos que analisam poluentes orgânicos ou inorgânicos e sua relação com a atividade metabólica de alguma enzima, sendo pura ou nativa (AMARIEI et al., 2020). Em estudo recente Ozocko et al (2020) mostra a diminuição da atividade metabólica de lodos ativados pelo Cr (VI) por meio de um método respirométrico.

Em outro estudo, com exposição do lodo nativo ao ibuprofeno e triclosan a um curto período de 60 minutos mostrou que a atividade da enzima esterase estava diminuída,

porém uma exposição a longo prazo, não causaram uma diminuição na atividade dessa enzima (AMARIEI et al., 2017 ; AMARIEI et al., 2020).

Em Paquini e colaboradores (2013), o ibuprofeno induziu uma diminuição da atividade bacteriana geral em todas as concentrações estudadas. No entanto, outros micropoluentes como eritromicina, ofloxacina, triclosan, 4-nonilfenol e ácidos perfluoroalquílicos induziram um aumento na matriz de polímeros extracelulares ligados em flocos de lodo ativado (PASQUINI et al., 2013). A matriz de polímeros extracelulares é composta por até 90% de proteínas e polissacarídeos, e secretada pelo metabolismo de microrganismos (WINGENDER; NEU; FLEMMING, 1999; FISCHER; MAJEWSKY, 2014).

A atividade enzimática no lodo não só uma medida indireta da viabilidade microbiológica, mas também uma medida que tem sido associada às respostas de estresse a comunidade microbiana de lodo ativado (KLATT; LAPARA, 2003). Como pode ser visto em um estudo Klatt et al (2003), uma alimentação restrita de nutrientes nas comunidades microbiológicas de lodo ativado pode causar um aumento na atividade enzimática devido ao estresse sofrido.

7.4 CONCLUSÃO

As fosfatases são enzimas responsáveis pela degradação de diversos subgrupos de compostos organofosforados naturais, assim desempenham papéis importantes no tratamento de efluentes por processo de lodos ativado. A inibição da fosfatase pode diminuir a eficiência da eliminação das cargas orgânicas em águas residuais que podem ocorrer devido à presença de oxianions metálicos. Esta foi a primeira vez que um ensaio de fluorescência de microplaca foi aplicado para determinar as relações dose-resposta para efeitos de inibição com amostras de lodos ativado.

O protocolo da microplaca desenvolvido junto com amostras de lodo nativo permitiu observar que vanádio (IC₅₀: 2,4) e tungstênio (IC₅₀: 2,6) têm um efeito inibitório sobre a fosfatase presente no lodo. Foi verificado a ocorrência de efeitos de inibição em concentrações de 0,025-50 $\mu\text{M L}^{-1}$ para o vanádio e 0,1-100 $\mu\text{M L}^{-1}$ para o tungstênio. Este estudo preliminar mostra que a presença desses metais nas águas residuais tem uma influência negativa na atividade da fosfatase microbiana. Trabalhos como esse melhoraram

nosso entendimento sobre a interação de poluentes com lodo durante o tratamento de águas residuais e acentuamos a necessidade de novas pesquisas para avaliar a relevância prática dos fenômenos.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho contribuiu com o monitoramento de resíduos farmacêuticos em rios e mananciais de uma grande capital brasileira, em evidenciar o problema da presença de resíduos de antimicrobianos em rios urbanos e a possível influência disso para a disseminação de bactérias multirresistentes nos rios. Além disso, esta tese também contemplou mais dois outros estudos elaborados em parcerias com outros grupos de pesquisas: uma proposta de tratamento terciário de efluentes para eliminação de resíduos de antimicrobianos e um estudo da influência dos oxiânions metálicos na degradação da matéria orgânica no tratamento de efluentes.

No Brasil, a degradação acentuada da qualidade da água dos rios nestes últimos anos, a visível falta de água potável em grandes centros urbanos, a polêmica do reuso de água e a baixa cobertura de tratamento de esgoto no país destacam a relevância desse trabalho. As principais metas com relação aos sistemas de esgotamento sanitário no país ainda são: a coleta, o transporte, o tratamento e a disposição ambientalmente e sanitariamente adequadas. Visando reduzir a incidência de doenças, mortalidade causadas pela água contaminada, e diminuição da carga poluidora antes do lançamento dos efluentes em corpos hídricos. Por isso, o monitoramento de micropoluentes em águas brasileiras se torna um problema pouco explorado e legislado pelas autoridades.

Entretanto, os resultados apresentados destacam a importância do monitoramento contínuo de micropoluentes em matrizes ambientais para subsidiar o estabelecimento de valores de referência e assim dar suporte a uma nova legislação, assegurando as condições de potabilidade da água. Além de reforçar a importância de um saneamento básico universal e adequado.

A conscientização da população também é um fator importante a ser trabalhado continuamente, pois a prescrição, consumo e descarte incorreto, principalmente de antibióticos, contribuem de forma significativa para o aumento dessa poluição nos ambientes aquáticos.

Apesar de existir variadas justificativas para a realização de trabalhos como esse, ainda é notável o pequeno número de artigos publicados em revistas internacionais, se levarmos em conta a dimensão do país, em que tem como finalidade a análise de resíduos de farmacêuticos em matrizes ambientais brasileiras.

Sendo o Brasil um país de interesse mundial por conta de sua reserva ecológica e biodiversidade, estudos ambientais de quantificação, impacto ambiental e de avaliação a exposição crônica a resíduos farmacêuticos, a fim de avaliar as consequências aos organismos consumidores são de grande relevância para monitorar a qualidade da água no país. Essa tese espera ter chamado a atenção para a presença dos micropoluentes de origem farmacêutica em águas superficiais, os impactos no meio ambiente e os problemas de saúde pública que essa poluição pode oferecer.

REFERÊNCIAS

ABNT. **NBR 12614: Waters: determination of biochemical oxygen demand (BOD): incubation method (20 ° C, five days)**, 1992.

ABRAHAM, W. R. et al. Occurrence and resistance of pathogenic bacteria along the Tietê River downstream of São Paulo in Brazil. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 35, n. 4, p. 339–347, 2007.

ADAMEK, E.; BARAN, W.; SOBCZAK, A. Photocatalytic degradation of veterinary antibiotics: Biodegradability and antimicrobial activity of intermediates. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 103, p. 1–9, 2016.

AGA, D. S. et al. Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 716, 2005.

AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Pharmaceuticals as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, p. 7273–7291, 2014.

ALBERO, B. et al. Determination of selected pharmaceutical compounds in biosolids by supported liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 52–58, 2014.

ALVES, T.; GIRARDI, R.; PINHEIRO, A. Micropoluentes orgânicos: ocorrência, remoção e regulamentação. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 14, n. 1, 2017.

AMARIEI, G. et al. Toxicological interactions of ibuprofen and triclosan on biological activity of activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v. 15, n. 334, p. 193–200, 2017.

AMARIEI, G. et al. Enzyme response of activated sludge to a mixture of emerging contaminants in continuous exposure. **PLoS ONE**, v. 15, n. (1), p. e0227267, 2020.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 1995.

ARNOSTI, C. et al. Extracellular enzymes in terrestrial, freshwater, and marine environments: Perspectives on system variability and common research needs. **Biogeochemistry**, v. 117, p. 5–21, 2014.

AUS DER BEEK, T. et al. Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 823–35, 2016.

AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. **Science of the Total Environment**, v. 1, n. 419, p. 208–15, 2012.

BABIĆ, S. et al. TiO₂ assisted photocatalytic degradation of macrolide antibiotics. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 6, p. 34–41, 2017.

BABIĆ, S.; PERIŠA, M.; ŠKORIĆ, I. Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media. **Chemosphere**, v. 91, n. 11, p. 1635–1642, 2013.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260–5, 2008.

BARRON, L.; TOBIN, J.; PAULL, B. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge

enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 10, n. 3, p. 353–361, 2008.

BATT, A. L.; BRUCE, I. B.; AGA, D. S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 2, p. 295, 2006.

BEAN, D. C. et al. Resistance among *Escherichia coli* to sulphonamides and other antimicrobials now little used in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 962–964, 2005.

BENDZ, D. et al. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 195–204, 2005.

BERETTA, M. et al. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 7, p. 1278–1286, 2014.

BERGERON, S. et al. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. **International Biodeterioration and Biodegradation**, n. 10, p. 370–374, 2015.

BERLIOZ-BARBIER, A. et al. Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 1259–1266, 2014.

BEUTLER, A. S. et al. Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. **Life Sciences**, v. 76, n. 26, p. 3107–3115, 13 maio 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BISOGNIN, R. P.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, v. 66, n. 210, p. 78–95, 2018.

BLAIR, B. D. et al. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 2116–2123, 2013.

BÖGER, B. et al. A importância do monitoramento de micropoluentes de origem farmacêutica em cursos d'água para saúde. In: CRV (Ed.). **Qualidade de vida e saúde em uma perspectiva interdisciplinar**. 1 ed. [s.l: s.n.]. p. 1–276.

BÖGER, B. et al. Micropoluentes emergentes de origem farmacêutica em matrizes aquosas do Brasil: uma revisão sistemática. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 725–739, 2015.

BÖGER, B. et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistant bacteria in subtropical urban rivers in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 402, n. 123448, 2021.

BOLLMANN, H. A.; DA MOTTA MARQUES, D. M. L. Influência da densidade populacional nas relações entre matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo em rios urbanos situados em áreas com baixa cobertura sanitária. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 343–352, 2006.

BOLLMANN, H. A.; EDWIGES, T. Evaluation of belem river water quality, curitiba, PR, with the use of quantitative and perceptive indicators. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, n. 14, p. 443–452, 2008.

BOURDAT-DESCHAMPS, M. et al. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental

samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective,. **Journal of chromatography. A**, v. 1349, p. 11–23, 2014.

BOXALL, A. B. A. et al. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 15, p. 286A-294A, 2003.

BOYD, G. R. et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **Science of the Total Environment**, v. 311, n. 1–3, p. 135–149, 2003.

BRAIN, R. A. et al. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 371–382, 2004.

BRANDT, E. M. F. et al. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. **Journal of Environmental Management**, 2013.

BURGESS, J. E.; PLETSCHE, B. I. **Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini-review** Water SA, 2008.

CALAMARI, D. et al. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and lambro in Northern Italy. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 1241–1248, 2003.

CALIMAN, F. A.; GAVRILESCU, M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 37, n. 4–5, p. 277–303, 2009.

CAMPANHA, M. B. et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 10, p. 7936–7947, 2015.

CHAMBERS, E. et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 852, n. 1–2, p. 22–34, 2007.

CHEN, M.; CHU, W. Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous solution by visible-light-mediated C-TiO₂ photocatalysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219–220, p. 183–189, 2012.

CHEN, Y. et al. Occurrence and environmental implications of pharmaceuticals in Chinese municipal sewage sludge. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1765–1772, 2013.

CHITESCU, C. L.; LUPOAE, M.; ELISEI, A. M. Pharmaceutical residues in the environment - New european integrated programs required. **Revista de Chimie**, v. 67, n. 5, p. 1008–1013, 2016.

CHOI, K. et al. Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. **Science of The Total Environment**, v. 405, n. 1–3, p. 120–128, 2008.

CHRISTIAN, T. et al. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 31, n. 1, p. 36–44, 2003.

ČIZMIĆ, M. et al. Photocatalytic degradation of azithromycin by nanostructured TiO₂ film: Kinetics, degradation products, and toxicity. **Materials**, v. 12, n. 6, p. 873, 2019.

CLARA, M. et al. The solids retention time - A suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. **Water Research**, v. 39, n. 1, p. 97–106, 2005.

CONTE, D. et al. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 62–69, 2017.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COUTINHO, F. H. et al. Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 441–52, 2014.

CRANS, D. C. Antidiabetic, Chemical, and Physical Properties of Organic Vanadates as Presumed Transition-State Inhibitors for Phosphatases. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 11899–11915, 2015.

DA COSTA MACHADO, I. F. et al. Contribuição química para o plano de gerenciamento de Águas residuais de serviÇos de saúde. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 548–553, 2017.

DANIKOWSKI, K. M.; CHENG, T. Alkaline Phosphatase Activity of Staphylococcus aureus Grown in Biofilm and Suspension Cultures. **Current Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 1226–1230, 2018.

DANNER, M. C. et al. Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. **Science of the Total Environment**, v. 10, n. 664, p. 793–804, 2019.

DE ALMEIDA, C. A. A. et al. Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2349–55, 2013.

DE AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. de L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Revisão da literatura. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.

DE JESUS GAFFNEY, V. et al. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 138–149, 2014.

DE JESUS GAFFNEY, V. et al. Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system and related human health risk assessment. **Water Research**, v. 72, n. 1, p. 199–208, 2015.

DE OLIVEIRA, D. V. et al. Genetic Background of β -Lactamases in Enterobacteriaceae Isolates from Environmental Samples. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 3, p. 599–607, 2017.

DE VOOGT, P. et al. Development of a common priority list of pharmaceuticals relevant for the water cycle. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 39–46, 2009.

DEL CARPIO, E. et al. Vanadium: History, chemistry, interactions with α -amino acids and potential therapeutic applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 372, p. 117–140, 2018.

DONNACHIE, R. L.; JOHNSON, A. C.; SUMPTER, J. P. A rational approach to selecting and ranking some pharmaceuticals of concern for the aquatic environment and their relative importance compared with other chemicals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 1021–7, 2016.

DROPA, M. et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4953–4958, 2016.

DU, B. et al. Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 966–974, 2016.

EBELE, A. J.; ABOU-ELWAFA ABDALLAH, M.; HARRAD, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2017.

EGGLETON, J.; THOMAS, K. V. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 973–980, 2004.

ELLIOTT, S. M. et al. Concentrations of pharmaceuticals and other micropollutants in groundwater downgradient from large on-site wastewater discharges. **PLoS ONE**, 2018.

ELORRIAGA, Y. et al. Human pharmaceuticals in wastewaters from urbanized areas of Argentina. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, p. 397–400, 2013.

EPA. Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC / MS / MS. **EPA Method**, n. December, p. 77, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION DECISION 2002/657/EC. **Official Journal of the European Communities**, 2002.

FATTA-KASSINOS, D. et al. The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment. **The Science of the total environment**, v. 409, n. 19, p. 3555–63, 2011.

FEKADU, S. et al. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. **Science of The Total Environment**, v. 654, p. 324–337, 2019.

FÉLIX-CAÑEDO, T. E.; DURÁN-ÁLVAREZ, J. C.; JIMÉNEZ-CISNEROS, B. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. **Science of the Total Environment**, v. 454–455, p. 109–118, 2013.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

FERRARI, B. et al. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1344–1354, 2004.

FERREIRA, A. M. C.; MÖDER, M.; LAESPADA, M. E. E. F. Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge within situ derivatization and determination by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 25, p. 3837–3844, 2011.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 148–157, 2012.

FERRO OROZCO, A. M.; CONTRERAS, E. M.; ZARITZKY, N. E. Biological removal of hexavalent chromium: evaluation of the metabolic activity of native and Cr (VI)-acclimated activated sludge using a respirometric method. **Environmental Technology (United Kingdom)**, 2019.

FICK, J. et al. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2522–7, 2009.

FISCHER, K.; MAJEWSKY, M. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 6583–6597, 2014.

FOSTER, J. D. et al. Tungstate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 354, n. 1, p. 125–132, 1998.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; CORÇÃO, G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related?. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 1, p. 250–5, 2011.

GALINDO-MIRANDA, J. M. et al. Occurrence of emerging contaminants in environmental surface waters

and their analytical methodology - A review. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 19, n. 7, p. 1871–1884, 2019.

GALUS, M. et al. Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 132–133, p. 212–22, 2013.

GARCIA-RODRÍGUEZ, A. et al. The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p. 11708–11728, 2014.

GAVALCHIN, J.; KATZ, S. E. The Persistence of Fecal-Borne Antibiotics in Soil. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 77, n. 2, p. 481–485, 1994.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes Endócrino no Ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GOLET, E. M.; ALDER, A. C.; GIGER, W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 17, p. 3645–51, 2002.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3929–3937, 2010.

GRUJIĆ, S.; VASILJEVIĆ, T.; LAUŠEVIĆ, M. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 25, p. 4989–5000, 2009.

GUARDABASSI, L. et al. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3499–502, 1998.

GUERRA, P. et al. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 473–474, p. 235–243, 2014.

GUNNARSSON, L. et al. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 15, p. 5807–5813, 2008.

HALLER, M. Y. et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 952, n. 1–2, p. 111–120.

HALLING-SØRENSEN, B. et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. **Chemosphere**, 1998.

HAM, Y. S. et al. Distribution of antibiotic resistance in urban watershed in Japan. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 98–103, 2012.

HAN, E. J.; LEE, D. S. Significance of metabolites in the environmental risk assessment of pharmaceuticals consumed by human. **Science of the Total Environment**, 2017.

HAQUE, M. M.; MUNEEER, M. Photodegradation of norfloxacin in aqueous suspensions of titanium dioxide. **Journal of Hazardous Materials**, v. 145, n. 1–2, p. 51–57.

HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 1–2, p. 5–17.

HEDGES PETH, M. L. et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater

discharges into Charleston Harbor, South Carolina. **Science of The Total Environment**, v. 437, p. 1–9.

HERNÁNDEZ, F. et al. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 466–485.

HERNÁNDEZ, F. et al. Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters. **Journal of hazardous materials**, v. 282, p. 86–95.

HERRERO, P. et al. A pressurised hot water extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method to determine polar benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. **Journal of Chromatography A**, v. 1355, p. 53–60, 2014.

HIGNITE, C.; AZARNOFF, D. L. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sciences**, v. 20, n. 2, p. 337–341.

HIRSCH, R. et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of The Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 109–118.

HU, X. et al. Mechanisms underlying the photocatalytic degradation pathway of ciprofloxacin with heterogeneous TiO₂. **Chemical Engineering Journal**, v. 380, p. 122366.

HU, X.; ZHOU, Q.; LUO, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 9, p. 2992–2998.

IBGE. **National survey on basic sanitation: 2000**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/en/statistics/multi-domain/environment/17312-national-survey-of-basic-sanitation.html?=&t=o-que-e>>.

ICH. **The International Conference on Harmonization. Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and methodology Q2(R1)**, 2005.

IDE, A. H. et al. Occurrence of Pharmaceutical Products, Female Sex Hormones and Caffeine in a Subtropical Region in Brazil. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 45, p. 1700334, 2017.

IWANE, T. et al. Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 73, n. 4, p. 339–347, 2007.

IWANE, T.; URASE, T.; YAMAMOTO, K. Possible impact of treated wastewater discharge on incidence of antibiotic resistant bacteria in river water. **Water Science and Technology**, v. 43, n. 2, p. 91–9, 2001.

JACKSON, C. R.; TYLER, H. L.; MILLAR, J. J. Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 80, p. 50399, 2013.

JI, K. et al. Prioritizing human pharmaceuticals for ecological risks in the freshwater environment of Korea. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 1028–36, 2016.

JIANG, X. et al. PPCPs in a drinking water treatment plant in the Yangtze River Delta of China: Occurrence, removal and risk assessment. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 13, n. 27, 2019.

JONES, O. A.; LESTER, J. N.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 163–7.

JONES, O. a et al. Fate and removal of typical pharmaceutical and personal care products in a wastewater treatment plant from Beijing: a mass balance study. **Science of the Total Environment**, v. 23, n. 4, p. 3–27.

K'OREJE, K. O. et al. From multi-residue screening to target analysis of pharmaceuticals in water: Development of a new approach based on magnetic sector mass spectrometry and application in the Nairobi River basin, Kenya. **Science of the Total Environment**, v. 437, p. 153–64, 2012.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, n. 1–2, p. 132–45, 2007.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3498–518, 2008.

KASSIM, A. et al. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: A cross-sectional stud. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 15, n. 21, 2016.

KAY, P.; BLACKWELL, P. A.; BOXALL, A. B. A. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1136–44, 2004.

KHAN, Z. A.; SIDDIQUI, M. F.; PARK, S. Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. **Diagnostics**, v. 9, n. 2, p. 49, 2019.

KIM, C. et al. Determination of 18 veterinary antibiotics in environmental water using high-performance liquid chromatography-q-orbitrap combined with on-line solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1084, p. 158–65, 2018.

KIM, M. K.; ZOH, K. D. Occurrence and removals of micropollutants in water environment. **Environmental Engineering Research**, v. 21, n. 4, p. 319–32, 2016.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1013–21.

KLATT, C. G.; LAPARA, T. M. Aerobic biological treatment of synthetic municipal wastewater in membrane-coupled bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 313–20, 2003.

KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202–11, 2002.

KOLVENBACH, B. A. et al. Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 8–14, 2014.

KRAH, D. et al. Micropollutant degradation via extracted native enzymes from activated sludge. **Water Research**, v. 95, p. 348–60, 2016.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: Emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - A review. **Chemosphere**, v. 45, n. 6–7, p. 957–69, 2001.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 311–320, 2004.

KÜMMERER, K. **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks**. 3. ed. 2001.

LARIVIÈRE, A. et al. Overview of Multiresidues Analytical Methods for the Quantitation of Pharmaceuticals in Environmental Solid Matrixes: Comparison of Analytical Development Strategy for Sewage Sludge,

Manure, Soil, and Sediment Samples. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 453–465, 2017.

LARSSON, D. G. J.; DE PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, n. 3, p. 751–755.

LEE, C. M.; PALANIANDY, P.; DAHLAN, I. Pharmaceutical residues in aquatic environment and water remediation by TiO₂ heterogeneous photocatalysis: a review. **Environmental Earth Sciences**, v. 76, n. 611, 2017.

LEITE, N. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; GRASSI, M. T. Distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from an urban river basin at the Metropolitan Region of Curitiba, Brazil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 6, p. 904–11, 2011.

LEVINE, I.N. **Physical Chemistry**, 6^oEd, Nova York, Higher Education, 2009, p. 576-577

LIN, T.; YU, S.; CHEN, W. Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China. **Chemosphere**, v. 152, p. 1–9, 2016.

LIN, W. C.; CHEN, H. C.; DING, W. H. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 2, p. 279–85, 2005.

LIZ, M. V. DE. Estudo da Potencialidade da fotocatalise heterogenea (TiO₂ e ZnO) e dos processos Fenton para remediação de águas contaminadas pelos Estrogênios: Estrona, 17 α -Estradiol e 17 β - Etinilestradiol, Universidade Federal do Paraná, 2013.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385–93, 2011.

LOOS, R. et al. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 2, p. 561–568.

LOPARDO, A.; FERNANDES, C.; AZEVEDO, J. Caracterização do Carbono Orgânico para Avaliação Ambiental da Qualidade da Água - Estudo de Caso do Lago do Parque Barigüi. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 13, n. 3, 2008.

LÓPEZ-SERNA, R.; PETROVIĆ, M. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). **Science of The Total Environment**, v. 440, p. 280–289.

LUO, Y. et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 19, p. 7220–225, 2010.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **The Science of the total environment**, v. 473–474, p. 619–41.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MADIKIZELA, L. M.; CHIMUKA, L. Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 7, p. 348, 2017.

MADIKIZELA, L. M.; TAVENGWA, N. T.; CHIMUKA, L. Status of pharmaceuticals in African water bodies: Occurrence, removal and analytical methods. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p.

211–20, 2017.

MAKINEN, P. L. Biochemical studies on a novel vanadate- and molybdate-sensitive acid phosphatase from human epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 85, n. 2, p. 118–24, 1985.

MANAGAKI, S. et al. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: Ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. **Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 23, p. 8004–010, 2007.

MANAIA, C. M. Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 173–181, 2017.

MATONGO, S. et al. Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 10298–308, 2015.

MEIERJOHANN, A.; BROZINSKI, J. M.; KRONBERG, L. Seasonal variation of pharmaceutical concentrations in a river/lake system in Eastern Finland. **Environmental Science: Processes and Impacts**, v. 18, n. 3, p. 342–9, 2016.

MELO, S. A. S. et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188–197, 2009.

METZGER, J. W. Drugs in Municipal Landfills and Landfill Leachates. In: KÜMMERER K (Ed.). **Pharmaceuticals in the Environment**. eds ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004.

MIMEAULT, C. et al. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 1, p. 44–54, 2005.

MINAYO, M. C. de S.; DE MIRANDA, A. C. **Saúde e Ambiente Sustentável: Estreitando nós**. 1. ed. [s.l.: s.n.]

MIRAJI, H. et al. Research Trends in Emerging Contaminants on the Aquatic Environments of Tanzania. **Scientifica**, v. 2016, p. 6, 2016.

MIRANDA-GARCÍA, N. et al. Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO₂ in a solar pilot plant. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 103, n. 3–4, p. 294–301, 2011.

MONTEIRO, M. A. et al. Development and validation of liquid chromatography-Tandem mass spectrometry methods for determination of beta-lactams, macrolides, fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in surface and drinking water from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 801–13, 2018.

NIKOLAOU, A.; MERIC, S.; FATTA, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1225–34, 2007.

NORAMBUENA, L.; GRAS, N.; CONTRERAS, S. Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 73, n. 1, p. 154–60, 2013.

NUDELMAN, S. N. **Estabilidade de medicamentos**. 1. ed. Buenos Aires: Ateneo, 1975.

OETKEN, M. et al. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 353–61, 2005.

- ORTEGA-PAREDES, D. et al. High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the Machángara urban river in Quito, Ecuador. **Journal of Water and Health**, v. 18, n. 1, p. 67–76, 2019.
- OUYANG, W. Y. et al. Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5697–707, 2015.
- PALMISANO, G. et al. Selectivity of hydroxyl radical in the partial oxidation of aromatic compounds in heterogeneous photocatalysis. **Catalysis Today**, v. 122, n. 1–2, p. 118–127, 2007.
- PASQUINI, L. et al. Impact of certain household micropollutants on bacterial behavior. Toxicity tests/study of extracellular polymeric substances in sludge. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 355–65, 2013.
- PENG, H. et al. Adsorption of norfloxacin onto titanium oxide: Effect of drug carrier and dissolved humic acid. **Science of The Total Environment**, v. 438, p. 66–71.
- PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3–27, 2015.
- PETROVIĆ, M. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 1–14, 2005.
- PRASSE, C. et al. Antiviral drugs in wastewater and surface waters: A new pharmaceutical class of environmental relevance? **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1728–35, 2010.
- PROCOP, G. W. et al. **Koneman's Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7. ed. North American: LWW, 2017.
- PRUDEN, A.; ARABI, M.; STORTEBOOM, H. N. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 21, p. 11541–9, 2012.
- RADJENOVIĆ, J. et al. Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 6–7, p. 1685–95, 2009.
- RADOVIĆ, T. et al. Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 1, p. 4092.
- RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 1985.
- RIVERA-UTRILLA, J. et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1268–87, 2013.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. **Journal of chromatography. A**, v. 1152, n. 1–2, p. 97–115.
- RUNNQVIST, H. et al. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction--are we developing sound extraction methods? **Journal of chromatography. A**, v. 1217, n. 16, p. 2447–70.
- SAGRISTÀ, E. et al. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge by direct hollow fiber supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 40, p. 6153–6158.

- SALGADO, R. et al. Analysis of 65 pharmaceuticals and personal care products in 5 wastewater treatment plants in Portugal using a simplified analytical methodology. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 12, p. 2862–71, 2010.
- SANTOS, L. H. M. L. M. et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of hazardous materials**, v. 175, n. 1–3, p. 45–95.
- SCHAUER, L. A. et al. Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. **Science of The Total Environment**, v. 468–469, p. 384–393.
- SCHEURER, M. et al. Occurrence and fate of the antidiabetic drug metformin and its metabolite guanilurea in the environment and during drinking water treatment. **Water Research**, v. 46, n. 15, p. 4790–802, 2012.
- SCHLÜSENER, M. P.; SPITELLER, M.; BESTER, K. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1003, n. 1–2, p. 21–28, 2003.
- SETTI, A. A. et al. **Introdução ao Gerenciamento de Recursos Hídricos**. 3. ed. – Brasília: Agência Nacional de Energia Elétrica, Superintendência de Estudos e Informações Hidrológicas, 2000.
- SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: An overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269–78, 2014.
- SIM, W.-J. et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, n. 2, p. 179–186.
- SLACK, R. J.; GRONOW, J. R.; VOULVOULIS, N. Hazardous components of household waste. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 5, p. 419–445, 2004.
- SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, 2007.
- SODRÉ, F. F.; DUTRA, P. M.; DOS SANTOS, V. P. Pharmaceuticals and personal care products as emerging micropollutants in Brazilian surface waters: A preliminary snapshot on environmental contamination and risks. **Ecletica Química**, v. 43, n. 1, 2018.
- SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 206, n. 1–4, p. 57–67.
- SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in Brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water, Air, and Soil Pollution**, 2010.
- SOSA-FERRERA, Z.; MAHUGO-SANTANA, C.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 23, 2013.
- SPERLING, M. Von. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4. ed. Editora UFMG, 2011.
- STANKIEWICZ, P. J.; GRESSER, M. J. Inhibition of Phosphatase and Sulfatase by Transition-State Analogues. **Biochemistry**, v. 27, n. 1, p. 206–12, 1988.
- STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, p. 17–36, 2019.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the total environment**, v. 225, n. 1–2, p. 135–41.

TAMTAM, F. et al. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. **Science of the Total Environment**, v. 393, n. 1, p. 84–95, 2008.

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water research**, v. 32, n. 11, p. 3245–60, 1998.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the total environment**, v. 225, n. 1–2, p. 81–90.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 166, n. 2, p. 145–167, 2003.

THOMAS, K. V. et al. Screening for selected human pharmaceuticals and cocaine in the urban streams of Manaus, Amazonas, Brazil. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 302–308, 2014.

TIEDEKEN, E. J. et al. Monitoring, sources, receptors, and control measures for three European Union watch list substances of emerging concern in receiving waters – A 20 year systematic review. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 1140–163, 2017.

TORRES, N. H. et al. Farmacos no ambiente - Revisão. **Revista de estudos ambientais**, v. 14, n. 4, p. 67–75, 2012.

TORRES, N. H. et al. Spatial and seasonal analysis of antimicrobials and toxicity tests with *Daphnia magna*, on the sub-basin of Piracicaba river, SP, Brazil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 6, p. 6070–76, 2017.

TUC DINH, Q. et al. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1238–1245.

VALDÉS, M. E. et al. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 389–96, 2014.

VARELA, A. R.; MANAIA, C. M. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 6, p. 3550–69, 2013.

VERAS, T. B. et al. Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river - PE, Brazil. **Chemosphere**, v. 222, p. 961–969, 2019.

VILANOVA, X. et al. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 2, p. 279–288, 2004.

VILANOVA, X.; BLANCH, A. R. Distribution and persistence of fecal bacterial populations in liquid and dewatered sludge from a biological treatment plant. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 361–8, 2006.

WAGIL, M. et al. A comprehensive approach to the determination of two benzimidazoles in environmental samples. **Chemosphere**, v. 119, n. Supplement, p. S35–S41, 2015.

WATKINSON, A. J. et al. Novel method for rapid assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified chromogenic agar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2224–29, 2007.

WELLINGTON, E. M. H. et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 155–65.

WHEELER, J. R. et al. Freshwater to saltwater toxicity extrapolation using species sensitivity distributions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 2459–67, 2002.

WHO. **WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation**, 2019.

WIEGEL, S. et al. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. **Chemosphere**, v. 57, n. 2, p. 107–126, 2004.

WILGA, J.; KOT-WASIK, A.; NAMIEŚNIK, J. Studies of human and veterinary drugs' fate in environmental solid samples - Analytical problems. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, n. 7, p. 601– 08, 2008.

WILLE, K. et al. A validated analytical method for the determination of perfluorinated compounds in surface-, sea- and sewagewater using liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 43, p. 6616–22, 2010.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H.-C. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: WINGENDER J., NEU T.R., F. H. (Ed.). **Microbial Extracellular Polymeric Substances**. eds ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 1999.

YAMAMOTO, F. Y. et al. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. **Chemosphere**, v. 186, p. 88–99, 2017.

YANG, C. M. et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 560–5, 2009.

YING, G. G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**, v. 32, n. 3, p. 417–31, 2006.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545–51, 2002.

YU, G. H. et al. Enzyme activities in activated sludge flocs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 3, p. 605–12, 2007.

YUAN, F. et al. Estimating the trend of micropollutants in lakes as decision-making support in IWRM: a case study in Lake Paranoá, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, v. 32, n. 1, p. 4891–4900, 2016.

ZHANG, S. et al. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1057–69.

ZHANG, W. et al. Effect of water composition on TiO₂ photocatalytic removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) and estrogenic activity from secondary effluent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 215–216, p. 252–258, 2012.

ZHANG, Y. et al. Typical pharmaceuticals in major WWTPs in Beijing, China: Occurrence, load pattern and calculation reliability. **Water Research**, v. 140, p. 291–300, 2018.

ZIYLAN, A.; INCE, N. H. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: treatability by conventional and non-conventional processes. **Journal of hazardous materials**, v. 187, n. 1–3, p. 24–36.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSEN, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 8,

p. 2760–70, 2009.

ZOU, L. K. et al. Erythromycin resistance and virulence genes in enterococcus faecalis from swine in china. **New Microbiologica**, v. 34, n. 1, p. 73–80, 2011.

ZUCCATO, E. et al. Presence of therapeutic drugs in the environment. **Lancet**, v. 355, n. 9217, p. 1789–1790, 2000.